

10/50/525

REPUBLIQUE FRANCAISE

PCT/FR 03/00157



REC'D 07 APR 2003

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 20 JAN. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04
Télécopie : 33 (1) 42 93 59 30
www.inpi.fr

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260899

REMISE DES PIÈCES DATE 18 JAN 2002 LIEU 75 INPI PARIS		Réervé à l'INPI	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		0200582	
DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI		18 JAN. 2002	
Vos références pour ce dossier <i>(facultatif)</i> B0097FR			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet <input checked="" type="checkbox"/>			
Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/>			
Demande divisionnaire <input type="checkbox"/>			
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N°	Date 1 / 1 / 1
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		N°	Date 1 / 1 / 1
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
METHODE D'IDENTIFICATION DE SUBSTANCES CAPABLES DE MODULER LA DIFFERENTIATION ADIPOCYTAIRE			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date 1 / 1 / 1 : N° Pays ou organisation Date 1 / 1 / 1 : N° Pays ou organisation Date 1 / 1 / 1 : N°	
		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »	
5 DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »	
Nom ou dénomination sociale		GENFIT	
Prénoms			
Forme juridique		Société Anonyme	
N° SIREN		4 . 2 . 4 . 3 . 4 . 1 . 9 . 0 . 7 .	
Code APE-NAF		7 . 3 . 1 . Z .	
Adresse	Rue		
	Parc Eurasanté - Lille Métropole 885, avenue Eugène Avinée		
Code postal et ville		59120	LOOS
Pays		France	
Nationalité		Française	
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>			
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>			
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>			
6 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE			
BECKER ET ASSOCIES 10 rue de Milan 75009 PARIS			

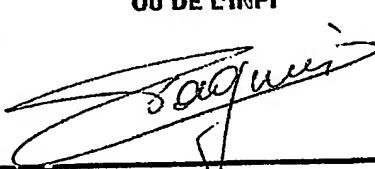
**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISSÉE CE 18 JAN 2002		Réervé à l'INPI
DATE	18 JAN 2002	
LIEU	75 INPI PARIS	
N° D'ENREGISTREMENT		0200582
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		

DB 540 W /260093

Vos références pour ce dossier : (facultatif)		B0097FR	
6 MANDATAIRE			
Nom		BECKER	
Prénom		Philippe	
Cabinet ou Société		BECKER ET ASSOCIES	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		97-0800	
Adresse	Rue	10, rue de Milan	
	Code postal et ville	75009	PARIS
N° de téléphone (facultatif)		01 44 53 84 00	
N° de télécopie (facultatif)		01 44 53 84 10	
Adresse électronique (facultatif)		becker@becker.fr	
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui	<input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques	
		<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques	
		<input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)	
		<input type="checkbox"/> Requise antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence) :	

Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes	
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)	VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI
BECKER Philippe n° 97-0800	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

METHODE D' IDENTIFICATION DE SUBSTANCES CAPABLES DE
MODULER LA DIFFERENCIATION ADIPOCYTAIRE

La présente invention concerne des méthodes de criblage de molécules actives, en particulier de molécules ayant une activité dans la modulation de la différenciation adipocytaire. L' invention se rapporte également à des constructions génétiques, cellules et compositions utiles pour la mise en œuvre de telles méthodes de criblage, par exemple des cellules pré-adipocytaires génétiquement modifiées pour sur-exprimer le récepteur *REV-ERB ALPHA*, ainsi que les procédés de préparation desdites cellules. L' invention peut être mise en œuvre pour l' identification de composés actifs ou utilisables comme têtes de séries pour le développement de médicaments actifs pour la prise en charge de pathologies métaboliques, notamment pour le traitement du diabète, de l' obésité, de l' insulino-résistance et/ou du syndrome X.

L' invention est basée notamment sur la mise en évidence et la caractérisation du rôle d' un récepteur nucléaire particulier, *REV-ERB ALPHA*, dans les mécanismes de différenciation adipocytaire, et notamment sur la capacité de ce récepteur, lorsqu' il est sur-exprimé, de sensibiliser les cellules à l' action de facteurs de différenciation adipocytaire. L' invention repose également sur l' obtention de vecteurs particuliers permettant l' expression du récepteur *REV-ERB ALPHA*, ainsi que de lignées cellulaires génétiquement modifiées, notamment des pré-adipocytes. Les résultats obtenus montrent une modulation de la différenciation adipocytaire de telles lignées lorsqu' elles sont mises en contact avec des agonistes ou des antagonistes des récepteurs intervenant directement ou indirectement dans le processus de différenciation adipocytaire.

Le tissu adipeux blanc est le principal lieu de stockage de l'énergie chez les eucaryotes. Son rôle est de mettre en réserve les triglycérides en période d'abondance et de les mobiliser lorsque l'apport énergétique 5 diminue. Une dérégulation de l'activité des adipocytes se traduit par l'obésité et ses conséquences comme le diabète non-insulino dépendant. Les adipocytes qui constituent le tissu adipeux blanc sont des cellules hautement spécialisées qui expriment un ensemble défini de gènes caractéristiques de leur différenciation (Fajas et al, Curr. Opin. Cell Biol 10: 165-173 (1998); Spiegelman, Diabetes 47:507-514 (1998), Gregoire F, 10 Phys. Rev 78, 783-809 (1998)).

La différenciation adipocytaire est un processus complexe dont les acteurs moléculaires sont de mieux en mieux connus (Fajas et al, Curr. Opin. Cell 15 Biol 10: 165-173 (1998); Spiegelman, Diabetes 47:507-514 (1998), Gregoire F, Phys. Rev 78, 783-809 (1998)). La différenciation adipocytaire est régulée de manière coordonnée par un réseau de plusieurs facteurs de transcription. Elle est initiée par la sortie du cycle cellulaire et l'activation 20 des facteurs C/EBP bêta, C/EBP delta et ADD1 (SREBP1c) qui induisent l'expression du récepteur nucléaire activé par les « proliférateurs des peroxisomes» de type gamma, ci après dénommé PPAR GAMMA, le coordinateur principal de la différenciation adipocytaire.

Le récepteur PPAR GAMMA stimule la sortie du cycle cellulaire et 25 l'expression de gènes spécifiques des adipocytes qui permettent le stockage de l'énergie. Enfin, le facteur de transcription C/EBP alpha coopère avec le récepteur PPAR GAMMA dans les étapes ultimes de la différenciation adipocytaire pour induire un nouvel ensemble de gènes et pour maintenir l'expression dudit récepteur PPAR GAMMA.

Le récepteur *REV-ERB ALPHA* est un récepteur nucléaire orphelin dont les ligands naturels ou artificiels sont inconnus. Sa séquence est codée par le brin non-codant du gène codant pour le récepteur aux hormones thyroïdiennes de type alpha (Lazar, M.A. et al. 1989, Mol.Cell.Biol. 9(3), 1128-1136), (Lazar, M.A. et al. 1990, DNA Cell Biol. 9(2), 77-83), (Laudet, V. et al. 1991, Nucleic Acid Res. 19(5), 1105-1012). Il agit principalement comme inhibiteur de la transcription. Son expression semble augmenter lors de la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes et est corrélée à l'expression des marqueurs de différenciation adipocytaire (Chawla, 1993 ; J.Biol.Chem. 266,12, pp 16265-16269).

Le récepteur *REV-ERB ALPHA* agit en tant que régulateur négatif de la transcription (Laudet, V. et al. 1995, Curr.Biol. 5(2),124-127). Il a été montré que le récepteur humain *REV-ERB ALPHA* régule sa propre expression (Adelman ,G. et al. 1996, Proc.Natl;Acad.Sci. USA 93(8), 3553-3558). L' ARNm du récepteur *REV-ERB ALPHA* se trouve fortement exprimé dans des tissus tels que les tissus adipeux, les muscles striés, les tissus hépatiques ou cérébraux, alors que son expression est moins abondante dans d' autres tissus.

Le récepteur *REV-ERB ALPHA* est induit durant la différenciation adipocytaire (Chawla, A. et al. 1993, J.Biol.Chem. 268(22), 16265-16269). Toutefois, le mécanisme moléculaire de cette régulation demeure inconnu. Il a également été observé que le récepteur *REV-ERB ALPHA* est impliqué dans la différenciation musculaire (Downes M. et al. 1995, Mol.Endocrinol. 9(12), 1666-1678) et dans le mécanisme de régulation du métabolisme lipidique, du fait de l' identification du gène apo AI (gène codant pour l' apolipoprotéine AI) du rat en tant que gène cible du récepteur *REV-ERB*

ALPHA dans le foie (Vu-Dac, N. 1998, *J.Biol.Chem.* 273, 25713-25720). Il a aussi été suggéré que le récepteur *REV-ERB ALPHA* agit comme un modulateur des signaux hormonaux thyroïdiens, (Lazar M.A. 1990, *J.Biol.Chem.* 265(22), 12859-12863), (Munroe, S.H. et al. 1991, *J.Biol.Chem.* 266(33), 22803-22086). En effet, le récepteur *REV-ERB ALPHA* se lie à l' élément de réponse de l' hormone DR4 (Spanjaard, R.A. et al. 1994, *Mol. Endocrinol.* 8(3), 286-295) et inhibe la formation de l' homodimère TR et des hétérodimères TR/RXR du TREs (Downes, M. et al. 1995, *Mol.Endocrinol.* 9, 1666-1678).

10

A ce jour, le rôle biologique du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans le tissu adipeux et son mécanisme d' action demeurent inconnus (Chawla, A. et al. 1993, *J.Biol.Chem.* 268(22), 16265-16269).

15 Les travaux menés par les inventeurs ont maintenant permis d' élucider des interactions entre deux récepteurs, *REV-ERB ALPHA* et PPAR GAMMA. Ces travaux ont montré que le récepteur PPAR GAMMA active la transcription du gène Rev-erb alpha via l' élément de réponse DR2 du promoteur du gène Rev-erb alpha (dénommé « Rev-DR2 »). Les inventeurs 20 ont ainsi pu déterminer que le gène Rev-erb alpha est une cible du récepteur PPAR GAMMA, que le récepteur *REV-ERB ALPHA* est un promoteur de la différenciation adipocytaire induite par le récepteur PPAR GAMMA, et qu' il joue un rôle modulateur dans le processus d' adipogenèse.

25

Les inventeurs ont également montré que, de manière surprenante, la sur-expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans des pré-adipocytes, comme la lignée cellulaire 3T3-L1, augmente la différenciation desdits

pré-adipocytes et accroît l'expression du récepteur PPAR GAMMA dans ces cellules.

Les inventeurs ont ainsi identifié des mécanismes régulateurs entre les 5 récepteurs *REV-ERB ALPHA* et d' autres récepteurs impliqués dans le programme de différenciation adipocytaire, notamment le récepteur PPAR GAMMA. Sur la base de ces travaux, il est maintenant proposé une nouvelle méthode de criblage de composés susceptibles d' interagir soit avec le récepteur *REV-ERB ALPHA* soit avec lesdits autres récepteurs 10 impliqués dans le programme de différenciation adipocytaire.

Une telle méthode est utile pour identifier des composés actifs dans le 15 traitement des pathologies liées à des anomalies métaboliques mettant en œuvre lesdits récepteurs, telles que la différenciation adipocytaire, le diabète, l' obésité, l' insulino-résistance et le syndrome X.

On sait que certains composés utiles pour le traitement des maladies liées à des anomalies de la différenciation adipocytaire, telles que le diabète ou l' obésité, agissent via leurs interactions avec le récepteur PPAR GAMMA. 20 Par exemple, les thiazolidinediones, aussi appelés glitazones, des composés utilisés pour le traitement de la résistance à l'insuline, ont été identifiés comme étant des ligands et des activateurs artificiels du récepteur PPAR GAMMA. Des dérivés des acides gras ont par ailleurs été identifiés comme étant des ligands naturels du récepteur PPAR GAMMA. 25 Les fibrates sont également des régulateurs puissants du métabolisme lipidique qui agissent en tant qu' activateurs du récepteur PPAR ALPHA.

Les résultats obtenus par les inventeurs, issus d' études *in vivo* et *in vitro* qui sont présentées dans la présente demande montrent que le traitement

avec la rosiglitazone (également appelée BRL49653 ou BRL) augmente l' expression de l' ARNm codant pour le récepteur *REV-ERB ALPHA*. Les glitazones, composés antidiabétiques couramment utilisés dans le traitement du diabète de type 2, induisent donc le programme de 5 différenciation adipocytaire via la liaison et l' activation du récepteur nucléaire PPAR GAMMA.

Un premier aspect de la présente invention concerne donc des méthodes de criblage de molécules actives, en particulier de molécules ayant une 10 activité dans la modulation de la différenciation adipocytaire, basées sur l' utilisation du récepteur *REV-ERB ALPHA* comme cible moléculaire.

Un autre aspect de l' invention se rapporte à des constructions génétiques, cellules et compositions utiles pour la mise en œuvre de telles 15 méthodes de criblage, par exemple des cellules pré-adipocytaires génétiquement modifiées pour sur-exprimer le récepteur *REV-ERB ALPHA*, ainsi que les procédés de préparation desdites cellules.

Un aspect particulier de l' invention porte également sur des virus 20 recombinants (ou sur des vecteurs viraux) codant un polypeptide *REV-ERB ALPHA*.

Un autre aspect de l' invention concerne l' utilisation de composés actifs pour la mise en œuvre de méthodes de traitement thérapeutique ou 25 vaccinal du corps humain ou animal. Il s' agit notamment de composés capables d' interférer sur la liaison du récepteur PPAR GAMMA au site Rev-DR2 ou, plus généralement, sur l' activité ou l' expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans la différenciation adipocytaire.

Récepteur *REV-ERB ALPHA*

La présente invention repose notamment sur l' identification du rôle du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans la différentiation des adipocytes, sur la 5 caractérisation des mécanismes qui sous-tendent ce rôle, et sur l' exploitation de cette molécule dans un but thérapeutique.

Au sens de la présente invention, le terme récepteur *REV-ERB ALPHA* désigne un récepteur nucléaire comprenant la séquence primaire en acides 10 aminés SEQ ID NO : 4, ou un fragment ou variant fonctionnel de celle-ci.

MTTLDNNNTGGVITYIGSSGSSPSRTSPESLYSDNSNGSFQSLTQGCPTYFPPSPT
 GSLTQDPARSFGSIPPSLSDDGSPSSSSSSSSSSSFYNGSPPGSLQVAMEDSSRV
 SPSKSTSNTKLNGMVLLCKVCGDVASGFHYGVHACEGCKGFFRRSIQQNIQYKRL
 15 KNENCSIVRINRNRCQQCRLFKKCLSVGMSRDAVRFGRIPKREKQRMLAEMQSAMNL
 ANNQLSSQCPLETSPTQHPTPGPMGPSPPPAPVPSPLVGFSQFPQQLTPPRSPSPE
 PTVEDVISQVARAHREIFTYAHDKLGSSPGNFNANHASGSPPATTPHRWENQGCPP
 APNDNNTLAAQRHNEALNGLRQAPSSYPTWPPGPAHHSCHQNSNSNGHRLCPTHV
 YAAPEGKAPANSPRQGN SKNVLLACPMNMYPHGRSGRTVQEIWEDFSMSFTPAVR
 20 EVVEFAKHIPGFRDLSQHDQVTLLKAGTFEVLMVRFASLFNVKDQTVMFSLRTTYSL
 QELGAMGMGDLLSAMFDSEKLN SLALTEEEGLFTA VV LVSADRSGMENSASVEQ
 LQETLLRALRALVLKNRPLETSRFTKLLLKL PDLRTLNNMHSEKLLSFRVDAQ
 (séquence SEQ ID NO :4)

25 Le terme « fragment » désigne typiquement un polypeptide comprenant de 5 à 200 acides aminés consécutifs de la SEQ ID NO : 4, préférentiellement de 5 à 150, encore plus préférentiellement de 5 à 100. Des exemples particuliers de fragments sont des polypeptides de 5 à 80 acides aminés. Préférentiellement, les fragments comprennent un domaine fonctionnel de 30 la séquence SEQ ID NO : 4, par exemple un domaine inhibiteur de la transcription et/ou un domaine de liaison à l' ADN. Le terme variant fonctionnel englobe les variants naturels, notamment ceux résultant de

polymorphisme(s), épissage(s), variation(s) entre espèces, etc.. Ce terme inclut également des variants synthétiques, notamment des polypeptides comprenant une séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 4 par une ou plusieurs mutations, délétions, substitutions et/ou additions d' un ou 5 plusieurs résidus. Préférentiellement, un variant synthétique comporte 75% d' homologie de séquence primaire avec la séquence SEQ ID NO : 4, plus préférentiellement, au moins 85%. Les fragments ou variants peuvent en outre comporter des régions hétérologues ajoutées ou des modifications chimiques, enzymatiques, immunologiques, etc.. De telles modifications 10 peuvent permettre par exemple de faciliter la production ou la purification du récepteur, d' améliorer sa stabilité, d' augmenter son activité, etc..

Dans un mode préféré de l' invention, le terme récepteur *REV-ERB ALPHA* désigne un récepteur d' origine humaine, notamment un récepteur 15 comprenant la séquence SEQ ID NO : 4 ou un fragment de celle-ci.

Le terme gène *Rev-erb alpha* désigne généralement toute portion du génome codant un récepteur *REV-ERB ALPHA* tel que défini ci-avant.

20 Le terme « construction génique *Rev-erb alpha* » ou « acide nucléique recombinant codant un récepteur *REV-ERB ALPHA* » désigne généralement tout acide nucléique codant un récepteur *REV-ERB ALPHA* tel que défini ci-avant. Il peut s' agir d' un ADN ou d' un ARN, par exemple d' un ADN génomique, d' un ADNc, d' un ARNm, d' un ADN 25 synthétique ou semi-synthétique. Ceux-ci peuvent être obtenus par clonage à partir de banques ou plasmides, ou par synthèse, ou par toute autre technique connue de l' homme de l' art.

Dans un mode de réalisation particulier de l' invention, la construction génique Rev-erb alpha est un acide nucléique comprenant la séquence SEQ ID NO : 3, un fragment de celle-ci, ou toute séquence s' hybridant avec celles-ci dans des conditions de stringence modérée et codant un 5 récepteur *REV ERB ALPHA*.

```

atg acgaccctgg actccaacaa caacacaggt
661 ggcgtcatca cctacattgg ctccagtgcc tccctcccaa gccgcaccag ccctgaatcc
721 ctctatagtg acaactccaa tggcagcttc cagtcctga cccaggctg tcccacccat
10 781 ttcccaccat cccccactgg ctccctcacc caagaccggc ctgcgcctt tgggagcatt
841 ccacccagcc tgagtatgtg cggctccct tcttcctcat ctccctcgcc gtcatcctcc
901 tcctcccttataatgggag cccccctggg agtctacaag tggccatggg ggacagcagc
961 cgagtgtccc ccagcaagag caccagcaac atcaccaggc tgaatggcat ggtgttactg
1021 tgtaaagtgt gtggggacgt tgccctgggc ttccactacg gtgtgcacgc ctgcaggggc
15 1081 tgcaagggtt tttccgtcg gagcatccag cagaacatcc agtacaaaag gtgtctgaag
1141 aatgagaatt gctccatcg tccatcgat cgcacccgt gccagcaatg tcgcctcaag
1201 aagtgtctct ctgtgggcat gtctcgagac gctgtgcgtt ttggcgcat ccccaaacga
1261 gagaaggcgc ggaatgtgc tgagatgcag agtgcgtga acctgtggcaaa caaccagggt
1321 agcagccagt gcccgttggg gacttcaccc acccagcacc ccacccagg ccccatgggc
20 1381 ccctcgccac cccctgctcc ggtccctca cccctgggtt gcttcctca gttccacaa
1441 cagctgacgc ctcccgatc cccaaaggcc tggaggatgt gatatcccg
1501 gtggcccggtt cccatcgaga gatcttcacc tacggccatg acaagctggg cagctcacct
1561 ggcaacttca atgccaacca tgcatcgatg agccctccag ccaccacccc acatcgctgg
1621 gaaaatcagg gctgcccacc tgcccccattt gacaacaaca ccttgctgc ccagcgcat
25 1681 aacgaggccc taaatggct ggcgcaggct ccctccctt accctccac ctggccctt
1741 ggccctgcac accacagctg ccaccaggcc aacagcaacg ggcacccgtt atgccccacc
1801 cacgtgtatg cagccccaga aggcaaggca cctgccaaca gtcccccggca gggcaactca
1861 aagaatgttc tgctggcatg tccatgtttttt atgtaccggc atggacgcag tggcgaacg
1921 gtgcaggaga tctgggagga ttctccatg agcttcacgc ccgctgtgcg ggagggtggta
30 1981 gagttgcca aacacatccc gggctccgt gaccttctc agcatgacca agtcacccgt
2041 cttaaaggctg gcacccatgg ggtgtatg gtgcgttgc ttctgttgc caacgtgaag
2101 gaccagacag tgatgttccctt aagccgcacc acctacagcc tgcaggagct tggtgcctt
2161 ggcatgggg gacccgttccatg tccatgttc gacccgttccatg agaagatcaa ctccctggc
2221 ctatccggagg aggaggctggg ccttccatgg ggggtggc ttgtctgtgc agaccgctcg
35 2281 ggcatggaga attccgcitc ggtggaggcc ctccaggaga cgctgtgcg ggctctcg
2341 gctctggc tgaagaaccg gcccctggag acttcccgctt tccatggatg gctgtcaag

```

2401 ctgccggacc tgccgaccct gaacaacatg cattccgaga agctgctgtc cttccgggtg

2461 gacgcccagt ga (SEQ ID NO: 3)

Des conditions de stringence modérées sont décrites par exemple dans
5 Maniatis et al.. Il s' agit, à titre d' exemple, des conditions suivantes :
incubation à 42°C pendant 12 heures dans un milieu comprenant 50%
formamide, 5 X SSPE, 5 X Denhardt's solution, 0,1% SDS.

Typiquement, l' acide nucléique recombinant ou la construction génique
10 comporte, outre une région codant le récepteur *REV-ERB ALPHA*, une ou
des régions de régulation de la transcription, typiquement un promoteur
et/ou un terminateur transcriptionnel. Ces régions régulatrices sont
choisies en fonction de l' hôte cellulaire considéré. Préférentiellement, il
s' agit de régions régulatrices fonctionnelles dans les cellules de
15 mammifères. A titre d' exemples on peut citer des promoteurs constitutifs
ou régulés, inductibles ou non, sélectifs de tissus ou ubiquitaires, forts ou
faibles, comme par exemple des promoteurs d' origine virale (par
exemple : CMV, LTR, SV40) ou provenant de gènes cellulaires. Dans un
mode de réalisation particulier, le promoteur est le promoteur du gène
20 *Rev-erb alpha*, comprenant par exemple la séquence SEQ ID NO : 1 ou une
région de celui-ci, par exemple un promoteur comprenant la séquence
AAAAGTGTGTCACTGGGGCA (SEQ ID NO : 2).

Dans un mode de réalisation particulier de l' invention, la construction
25 génique *Rev-erb alpha* est un acide nucléique comprenant les séquences
SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 2, un fragment de celles-ci ou toute
séquence s' hybridant avec celles-ci dans des conditions de stringence
modérée. Dans un mode plus spécifique, la construction génique *Rev-erb*
alpha est un acide nucléique comprenant une séquence codant un

polypeptide SEQ ID NO :4 liée de manière opérationnelle à un promoteur transcriptionnel comprenant la séquence SEQ ID NO : 1 ou un fragment de celle-ci, notamment un promoteur transcriptionnel comprenant la séquence SEQ ID NO : 2.

5

Cellules génétiquement modifiées

Un objet particulier de la présente invention réside dans une population de cellules comprenant un acide nucléique recombinant codant un récepteur
10 *REV-ERB ALPHA*.

Les cellules peuvent être toute cellule cultivable, de préférence de mammifère, par exemple humaine. Il peut s' agir de cellules primaires ou de lignées établies. De préférence, les cellules hôtes sont des cellules pré-
15 adipocytaires. De telles cellules se définissent généralement comme des cellules de type fibroblaste, qui sont capables de se différencier en adipocytes dans des conditions de culture appropriées. Plus spécifiquement, il s' agit de cellules d'origine mésodermique, incapables de se différencier en chondroblaste, en ostéoblaste ou en myoblaste et qui, dans des conditions favorables propres à la cellule en question, se
20 différencient en adipocytes et expriment plusieurs marqueurs de différenciation caractéristiques des adipocytes. Des exemples de cellules de pré-adipocytes utilisables pour la mise en œuvre de l' invention sont notamment les lignées cellulaires 3T3-L1 (Référence ATCC : CL-173),
25 3T3-F442A (Green H. et al., Cell 5 :19-27 (1975)), ob17 (Negrel R. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA., 75 :6054-6058 (1978)) ou ob1771 (Doglio A. et al. Biochem J., 238 :123-129 (1986)).

Un objet particulier de l'invention réside donc dans une cellule pré-adipocytaire génétiquement modifiée, caractérisée en ce qu'elle comprend un acide nucléique recombinant codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*.

5

D'autres exemples de cellules utilisables dans le cadre de l'invention sont des cellules procaryotes, des cellules de levure ou des cellules de mammifères, notamment des cellules embryonnaires ou des cellules telles que CHO, des fibroblastes, Vero, etc.

10

L'acide nucléique recombinant présent dans les cellules permet à ces cellules d'exprimer un récepteur *REV-ERB ALPHA*, ou de sur-exprimer un tel récepteur, lorsque les cellules possèdent déjà un niveau basal d'expression. Ainsi, dans le cas de cellules pré-adipocytaires, l'acide nucléique permet généralement aux cellules de sur-exprimer un récepteur *REV-ERB ALPHA*, c'est-à-dire de produire le récepteur à un niveau supérieur à celui observé dans les mêmes cellules en l'absence de construction d'acide nucléique recombinant. Le terme sur-expression désigne généralement une expression augmentée notamment d'un facteur 2, plus généralement d'un facteur 3, idéalement d'un facteur 5 au moins. Les cellules sont préférentiellement des cellules de mammifères, en particulier des cellules humaines. Il est entendu que des cellules d'autres espèces peuvent être utilisées, comme par exemple des cellules de souris, rat, singe, hamster, etc..

25

Un objet particulier de la présente invention concerne donc une cellule, notamment pré-adipocytaire, génétiquement modifiée sur-exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA*. Le terme génétiquement modifié indique que

la cellule (ou un ancêtre de celle-ci) a été modifiée pour contenir un acide nucléique recombinant codant ledit récepteur.

Typiquement, l' acide nucléique recombinant ou la construction génique 5 comporte, outre une région codant le récepteur *REV-ERB ALPHA*, une ou des régions de régulation de la transcription, typiquement un promoteur et/ou un terminateur transcriptionnel, tels que définis ci-avant. L' acide nucléique peut être présent ou incorporé dans un vecteur plasmidique, viral, etc.. Il peut être intégré au génome des cellules, ou rester sous 10 forme extra-chromosomique (réplicative ou non).

L' invention a également pour objet un procédé de préparation de cellules recombinantes exprimant un récepteur *REV-ERB ALPHA*, notamment de cellules pré-adipocytaires génétiquement modifiées sur-exprimant un récepteur *REV-ERB ALPHA* ou un acide nucléique recombinant tels que 15 définis ci-dessus. Le procédé de l' invention comprend, de manière générale, l' introduction d' un acide nucléique recombinant tel que défini ci-avant codant un récepteur REV ERB ALPHA dans une cellule hôte. Les cellules hôtes peuvent être toute population de cellules telle que décrite 20 ci-avant, de préférence un pré-adipocyte, notamment les lignées cellulaires 3T3-L1, 3T3-F442A, ob17 ou ob1771.

Selon un premier mode de réalisation préféré de l' invention, les cellules recombinantes sont obtenues par transfection de cellules hôtes au moyen 25 d' un vecteur plasmidique comprenant une construction génique Rev-erb alpha. Avantageusement, la transfection est réalisée en présence d' une seconde construction génique codant un gène de sélection ou de résistance, et les cellules sont sélectionnées sur la base de l' expression

dudit gène de sélection ou de résistance ainsi que de l' acide nucléique codant REV ERB ALPHA.

Au sens de l' invention, le terme « transfection » désigne, de manière générale, toute technique permettant le transfert d' un acide nucléique dans une cellule. Il peut s' agir de techniques chimiques, physiques, biologiques, etc.. A titre d' exemple, on peut citer l' électroporation, la précipitation au phosphate de calcium, l' utilisation d' agents facilitant la transfection, comme par exemple de lipides, polymères, peptides, etc., ou encore l' emploi de techniques physiques telles que le « gene gun », l' utilisation de projectile, le bombardement, etc..

Dans un mode particulier de mise en œuvre, le procédé comprend la cotransfection des cellules avec un vecteur plasmidique comprenant ledit acide nucléique recombinant et avec un vecteur plasmidique comportant un gène de résistance à un antibiotique, les cellules étant sélectionnées pour leur résistance audit antibiotique et pour leur expression dudit acide nucléique recombinant. Selon un mode préféré de mise en œuvre de l' invention, les cellules recombinantes sont obtenues par co-transfection de cellules hôtes avec une construction génique Rev-erb alpha qui permet la sur-expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* et avec une construction génique qui permet la sur-expression d' un gène de résistance à un antibiotique. Les cellules recombinantes sont ensuite sélectionnées en présence de l' antibiotique et testées pour leur sur-expression du récepteur *REV-ERB ALPHA*.

Selon un mode particulier de l' invention, l' antibiotique utilisé est choisi parmi les substances suivantes citées à titre d' exemple non limitatifs : néomycine, zéocine, hygromycine, blasticidine, etc..

Dans un mode particulier de mise en œuvre du procédé, l' acide nucléique est introduit par transfection au moyen d' un vecteur plasmidique comportant en outre un gène de résistance à un antibiotique, les cellules étant sélectionnées pour leur résistance audit antibiotique et pour leur expression de l' acide nucléique recombinant.

5 Selon cette variante de l' invention, la construction génique Rev-erb alpha qui permet la sur-expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* comporte également une cassette fonctionnelle qui permet la sur-expression d' un gène de résistance à un antibiotique. Les cellules recombinantes sont 10 ensuite sélectionnées en présence de l' antibiotique et testées pour leur sur-expression du récepteur *REV-ERB ALPHA*. Selon un mode particulier de l' invention l' antibiotique utilisé est choisi parmi les substances suivantes citées à titre d' exemple non limitatifs : neomycine, zeocine, hygromycine, blasticidine, etc..

15.

Dans un autre mode particulier de réalisation, l' acide nucléique est introduit par transfection au moyen d' un vecteur plasmidique qui comporte en outre un gène de résistance à un antibiotique et une origine de réplication eucaryote, les cellules étant sélectionnées pour leur 20 résistance audit antibiotique et pour leur expression de l' acide nucléique recombinant. Selon un mode plus particulier, la construction génique Rev-erb alpha qui permet la sur-expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* comporte donc également une cassette fonctionnelle qui permet la sur-expression d' un gène de résistance à un antibiotique et une origine de 25 réplication eucaryote. Les cellules recombinantes sont ensuite sélectionnées en présence de l' antibiotique et testées pour leur sur-expression du récepteur *REV-ERB ALPHA*. Selon un mode particulier de l' invention, l' antibiotique utilisé est choisi parmi les substances

suivantes citées à titre d' exemple non limitatifs : neomycine, zeocine, hygromycine, blasticidine, etc..

5 Selon un autre mode préféré de réalisation du procédé de l' invention, l' acide nucléique est introduit dans les cellules par infection au moyen d' un vecteur viral comprenant ledit acide nucléique. Selon un mode particulièrement préféré de mise en œuvre de l' invention, l' introduction est réalisée en utilisant un virus recombinant comprenant l' acide
10 nucléique recombinant codant le récepteur *REV ERB ALPHA* et, le cas échéant, le gène de sélection ou de résistance (« infection »). Différents types de virus recombinants peuvent être employés, comme par exemple des rétrovirus, des adénovirus, des AAV (Adenovirus Associated Virus), des virus de l' herpès, des baculovirus modifiés, etc.. Les virus
15 recombinants préférés sont les adénovirus et les rétrovirus recombinants.

Dans un mode de réalisation préféré, les cellules recombinantes (présentant avantageusement une sur-expression de l' ARN codant pour le récepteur *REV-ERB ALPHA*) sont obtenues par infection des cellules hôtes, notamment des pré-adipocytes, au moyen de vecteurs viraux, de
20 préférence des adénovirus ou des rétrovirus, lesdits vecteurs contenant un acide nucléique codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*.

A cet égard, un autre objet de l' invention réside dans un vecteur viral
25 comprenant un acide nucléique codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*. Un autre objet de l' invention réside dans un virus recombinant comprenant, dans son génome, un acide nucléique codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*. Préférentiellement, le vecteur viral est un vecteur défectif pour la réplication, c' est-à-dire incapable de réplication autonome dans une

cellule. Typiquement, un vecteur viral est défectif pour un ou plusieurs gènes viraux essentiels à la réplication. Dans le cas des rétrovirus, les principaux gènes viraux sont les gènes gag, pol et env. Dans le cas des adénovirus, les principaux gènes sont contenus dans les régions E1A, E1B, 5 E4 et E2. Dans les AAV, il s' agit des régions Rep et Cap du génome. La construction de vecteurs viraux, défectifs pour l' un ou plusieurs (ou l' ensemble) des gènes viraux et comprenant un acide nucléique d' intérêt est connue de l' homme de l' art. Ces techniques utilisent par exemple des lignées d' encapsidation et/ou de vecteurs ou virus helper, comme 10 illustré dans les exemples.

Un objet particulier de l' invention concerne :

- un adénovirus recombinant défectif comprenant, dans son génome, un acide nucléique codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*. L' adénovirus est préférentiellement un adénovirus du groupe C, notamment Ad5, et/ou comporte avantageusement une délétion de tout ou partie de la région E1A et/ou E1B et/ou E4 ;
- un rétrovirus recombinant défectif comprenant, dans son génome, un acide nucléique codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*. Le rétrovirus est préférentiellement un rétrovirus dérivé de MLV (Mouse Leukemia Virus) ou un lentivirus, et/ou comporte avantageusement une délétion de tout ou partie de la région gag et/ou pol et/ou env.

25

Selon un mode particulier de mise en œuvre de l' invention, la préparation (e.g., transfection, infection) des cellules, notamment des pré-adipocytes est effectuée avec une construction génique Rev-erb alpha qui comporte, outre une région codant le récepteur *REV-ERB ALPHA*, par exemple la

SEQ ID NO : 3, une ou des régions de régulation de la transcription, typiquement un promoteur et/ou un terminateur transcriptionnel. Selon un mode préféré de l' invention, il s' agit de régions régulatrices fonctionnelles dans les cellules de mammifères. A titre d' exemples non limitatifs on peut citer des promoteurs constitutifs ou régulés, inductibles ou non, sélectifs de tissus ou ubiquitaires, forts ou faibles, comme par exemple des promoteurs d' origine virale (par exemple : CMV, LTR, SV40) ou provenant de gènes cellulaires.

10 Selon un mode particulier de mise en œuvre de l' invention, la préparation (e.g., transfection) des cellules (e.g., pré-adipocytes) est effectuée avec une construction génique Rev-erb alpha qui comporte, outre une région codant le récepteur *REV-ERB ALPHA*, par exemple la SEQ ID NO : 3, le promoteur du gène Rev-erb alpha, par exemple comprenant la séquence SEQ ID NO : 1, ou comprenant une région de celui-ci, par exemple de séquence SEQ ID NO : 2. Selon un autre mode particulier, la préparation est réalisée avec une séquence choisie parmi ou comprenant les séquences SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 3.

15 20 Pour la préparation des cellules recombinantes de l' invention, les cellules hôtes peuvent être mises en contact avec le gène Rev-erb alpha ou l' acide nucléique recombinant ou le vecteur ou le virus dans toute condition appropriée, puis les cellule recombinantes sont récupérées. La mise en contact peut être réalisée dans tout support adapté et dans tout milieu de culture approprié au type cellulaire (par exemple : DMEM, RPMI, etc.).

Dans un mode de réalisation particulier, après l' infection ou la transfection, on sélectionne les lignées stables de cellules en culture. Les

cellules génétiquement modifiées préférées présentant une sur-expression du gène codant le récepteur *REV-ERB ALPHA* sont des lignées stables.

Méthodes de Criblage

5

La présente invention a aussi pour objet des méthodes d' identification, de sélection, de caractérisation ou d' optimisation de composés capables de moduler la différenciation adipocytaire. Ces méthodes peuvent être réalisées en tests cellulaires ou *in vitro*, par exemple par des tests de 10 liaison. Ces méthodes utilisent essentiellement un récepteur REV ERB ALPHA (ou un acide nucléique correspondant) comme cible moléculaire.

Dans un premier mode de mise en œuvre, la présente invention a pour 15 objet une méthode d' identification, de sélection, de caractérisation ou d' optimisation de composés capables de moduler la différenciation adipocytaire, caractérisée en ce que (i) on met en contact un composé à tester avec des cellules (de préférence pré-adipocytaires) telles que définies ci-dessus, (ii) on mesure ou on détermine la différenciation adipocytaire desdites cellules et (iii), de préférence, on compare cette 20 différenciation à la différenciation adipocytaire des mêmes dites cellules en l' absence dudit composé à tester.

De préférence, les cellules sont des cellules pré-adipocytaires telles que décrites ci-avant, plus particulièrement des cellules pré-adipocytaires 25 (sur-)exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA*.

Selon une forme de réalisation préférée de la méthode de l' invention, on met en contact le composé à tester avec des cellules (de préférence des cellules génétiquement modifiées sur-exprimant le récepteur *REV-ERB*

ALPHA) en présence ou en absence d' au moins un activateur d' un récepteur impliqué dans le programme de différenciation adipocytaire ou d' au moins un activateur d' un gène codant un récepteur impliqué dans le programme de différenciation adipocytaire.

5

Les résultats présentés dans les exemples montrent en effet que, de manière surprenante, l' expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans les cellules recombinantes de l' invention sensibilise les pré-adipocytes à l' action de facteurs de différenciation adipocytaire et favorise le 10 programme de différenciation. Dans ces conditions, la sélection de composés modulant cette différenciation est grandement facilitée.

Dans une première variante de l' invention, on utilise au moins un activateur d' un récepteur impliqué dans le programme de différenciation 15 adipocytaire, comme par exemple et de manière non-limitative, un activateur du récepteur PPAR GAMMA. L' activateur du récepteur PPAR GAMMA est par exemple choisi dans le groupe comprenant de manière non limitative : les thiazolidinediones (rosiglitazone, troglitazone, englitazone, ciglitazone, pioglitazone, KRP-297), les N-(2-benzoylphenyl)-L-tyrosines, la 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandine J2, 20 etc..

Dans une autre variante, on utilise au moins un activateur d' un gène 25 d' un récepteur impliqué dans le programme de différenciation adipocytaire. A titre d' exemple, non limitatif, on met en contact le composé à tester avec des cellules génétiquement modifiées sur-exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA* en présence ou en absence d' au moins un activateur du gène PPAR gamma. De préférence,

l' activateur du gène PPAR gamma est choisi dans le groupe comprenant : C/EBP beta, C/EBP delta, ADD1 (SREBP1c).

Le composé et l' activateur peuvent être mis en contact en même temps 5 avec les cellules, ou de manière séquentielle. Typiquement, l' activateur est ajouté en premier, suivi du composé test.

La mesure de la différenciation adipocytaire peut être réalisée par coloration des cellules différenciées. Le colorant est par exemple choisi 10 dans le groupe comprenant le colorant Oil Red O, Sudan Black.

La mesure de la différenciation adipocytaire peut aussi être réalisée par détermination du transport ou de la synthèse d' acides gras.

La mesure de la différenciation adipocytaire peut encore être réalisée par détermination de l' expression d' au moins un marqueur spécifique des 15 adipocytes différenciés, de préférence d' un marqueur choisi dans le groupe comprenant : aP2, adipsine et leptine.

La méthode de l' invention est remarquable en ce qu' elle permet :

- d' identifier des composés capables de moduler l' activité du récepteur *REV-ERB ALPHA*, tels que des composés capables de moduler l' expression du gène Rev-erb alpha ou des composés constituant des agonistes ou antagonistes du récepteur *REV-ERB ALPHA*. Ainsi, la méthode de l' invention permet notamment d' identifier des composés capables d' augmenter la différenciation adipocytaire et constituant des activateurs de l' expression du gène Rev-erb alpha ou des agonistes du récepteur *REV-ERB ALPHA*.
- d' identifier indirectement, en l' absence d' activateur du gène PPAR gamma et d' activateur du récepteur PPAR GAMMA, des

composés capables d' augmenter la différenciation adipocytaire qui agissent comme des agonistes du récepteur PPAR GAMMA.

Selon des mises en œuvre particulières, la méthode de l' invention 5 permet :

- d' identifier des composés capables de diminuer la différenciation adipocytaire et constituant des antagonistes du récepteur *REV-ERB ALPHA*.
- d' identifier des composés capables d' augmenter la différenciation adipocytaire constituant des agonistes du récepteur *REV-ERB ALPHA*.
- d' identifier, en présence d' activateur du gène PPAR gamma et/ou d' activateur du récepteur PPAR GAMMA, des composés capables de réduire la différenciation adipocytaire.
- d' identifier des composés agonistes du récepteur PPAR GAMMA.

On entend par agoniste ou antagoniste d' un récepteur un composé qui se lie audit récepteur et active ou inhibe son activité, respectivement.

20 Le composé test peut être d' origine et de nature variées. Il peut s' agir de composés isolés, d' extraits biologiques, de molécules organiques ou inorganiques, de banques de molécules (synthétiques, peptides, acides nucléiques, etc.) ou de microorganismes, etc.. Le composé test peut être 25 mis en contact avec la construction d' acide nucléique ou les cellules sur (ou dans) tout support approprié et notamment sur une plaque, dans un tube ou une flasque, une membrane, etc.. Généralement, la mise en contact est réalisée dans une plaque multipuits ce qui permet de conduire, en parallèle, des essais nombreux et variés. Parmi les supports typiques on

trouve des plaques de microtitration et plus particulièrement des plaques 96 ou 384 puits (ou plus). Selon le support et la nature du composé test, des quantités variables de cellules peuvent être utilisées lors de la mise en œuvre des méthodes décrites. De manière classique, 10^3 à 10^6 cellules 5 sont mises en contact avec un type de composé test, dans un milieu de culture approprié, et de manière préférentielle entre 10^4 et 10^5 cellules. La quantité (ou la concentration) de composé test peut être ajustée par l' utilisateur selon le type de composé (sa toxicité, sa capacité de pénétration cellulaire, etc.), le nombre de cellules, la longueur de la 10 période d' incubation, etc.. Généralement, les cellules sont exposées à des quantités de composés test qui varient de 1nM à 1mM. Il est bien sûr possible de tester d' autres concentrations sans dévier de la présente invention. Chaque composé peut de plus être testé en parallèle, à différentes concentrations. Par ailleurs, différents adjuvants et/ou vecteurs 15 et/ou produits facilitant la pénétration des composés dans les cellules peuvent, en outre, être utilisés si nécessaire. Le contact peut être maintenu par exemple entre quelques minutes et plusieurs heures ou jours, particulièrement entre 5 et 72 heures, généralement entre 12 et 48 heures.

20 Selon un autre mode de réalisation, la méthode de l' invention comprend la sélection de composés capables de moduler l' expression du récepteur *REV-ERB ALPHA*, notamment de moduler l' effet du récepteur PPAR GAMMA sur le promoteur du gène Rev-erb alpha. En effet, les inventeurs ont à présent mis en évidence que le récepteur PPAR GAMMA est 25 responsable d' une modulation de l' expression du récepteur *REV-ERB ALPHA*, et que cette modulation implique une interaction entre le récepteur PPAR GAMMA et le promoteur du gène Rev-erb alpha, notamment au niveau de la région Rev-DR2 (SEQ ID NO : 2).

L'invention concerne également une méthode d'identification, de sélection, d'optimisation ou de caractérisation de composés capables de moduler la différenciation adipocytaire, caractérisée en ce qu'elle 5 comprend (i) la mise en contact d'un composé test et d'un acide nucléique comprenant la séquence Rev-DR2 ou un équivalent fonctionnel de celle-ci, en présence de récepteur PPAR GAMMA, (ii) la mise en évidence d'une liaison du récepteur PPAR GAMMA sur cet acide nucléique et, éventuellement, (iii) la comparaison de cette liaison à celle observée en 10 l'absence de composé test, les composés test modulant la liaison du récepteur PPAR GAMMA étant des composés modulant la différenciation adipocytaire.

La mesure de la fixation éventuelle du composé test, du récepteur PPAR 15 GAMMA ou d'un complexe formé du récepteur PPAR GAMMA et dudit composé test sur l'élément de réponse peut être effectuée par toute méthode connue de l'homme du métier par exemple en détectant un signal produit par l'élément de réponse suite à ladite fixation. Il peut s'agir de toutes méthodes directes ou indirectes, comme celles utilisant un gène 20 rapporteur, des tests de liaison, etc..

Ainsi, une méthode particulière de l'invention comprend la mise en contact d'un composé test et d'un acide nucléique comprenant la séquence Rev-DR2 ou un équivalent fonctionnel de celle-ci, en présence du récepteur 25 PPAR GAMMA, et la mise en évidence d'une liaison du récepteur PPAR GAMMA sur cet acide nucléique. La liaison est avantageusement comparée à celle observée en l'absence de composé test. Dans un autre mode de réalisation, le composé test et le récepteur PPAR GAMMA sont mis en contact avec un système rapporteur comprenant (i) un promoteur

transcriptionnel comprenant une ou plusieurs copies de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un variant fonctionnel de celle-ci et (ii) un gène rapporteur, et l'activité du composé test est déterminée par mesure de son effet sur l'expression du gène rapporteur induite par le récepteur PPAR GAMMA.

5

Un objet particulier de l'invention concerne ainsi une méthode d'identification, de sélection, d'optimisation ou de caractérisation de composés capables de moduler la différenciation adipocytaire, caractérisée en ce qu'elle comprend la mise en contact d'un composé test et du récepteur PPAR GAMMA avec un système rapporteur comprenant (i) un promoteur transcriptionnel comprenant une ou plusieurs copies de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un variant fonctionnel de celle-ci et (ii) un gène rapporteur, et l'évaluation de l'activité du composé test par mesure de son effet sur l'expression du gène rapporteur induite par le récepteur PPAR GAMMA

Le gène rapporteur peut être placé sous le contrôle de tout promoteur (par exemple la SEQ ID NO : 1) dont la séquence comprend la séquence SEQ ID NO : 2 ou un variant fonctionnel de celle-ci. Cette séquence particulière peut être présente à raison d'une ou de plusieurs copies dans le promoteur (préférentiellement 1 à 10 et encore plus préférentiellement 1 à 6), en amont ou en aval ou en interne, dans la même orientation ou dans l'orientation opposée. Dans un mode préféré de mise en œuvre de l'invention, le gène rapporteur est placé sous le contrôle d'un promoteur qui comprend une ou plusieurs copies de la séquence SEQ ID NO : 2. Préférentiellement, il s'agit d'un promoteur dont le différentiel d'activité en l'absence et en présence de récepteur PPAR GAMMA ou d'un équivalent fonctionnel peut être détecté.

A cet égard, l'élément de réponse au récepteur PPAR GAMMA peut être associé à un promoteur minimal transcriptionnel. Le promoteur minimal est un promoteur transcriptionnel ayant une activité basale faible ou inexiste, et susceptible d'être augmentée en présence d'un activateur transcriptionnel (par exemple le récepteur PPAR GAMMA). Un promoteur minimal peut donc être un promoteur naturellement faible dans les cellules de mammifère, c'est-à-dire produisant une expression non toxique et/ou non suffisante pour obtenir un effet biologique prononcé. Avantageusement, un promoteur minimal est une construction préparée à partir d'un promoteur natif, par délétion de région(s) non essentielle(s) à l'activité transcriptionnelle. Ainsi, il s'agit de préférence d'un promoteur comprenant essentiellement une boîte TATA, généralement d'une taille inférieure à 160 nucléotides, centrée autour du codon d'initiation de la transcription. Un promoteur minimal peut ainsi être préparé à partir de promoteurs viraux, cellulaires, forts ou faibles, tels que par exemple le promoteur du gène de la thymidine kinase (TK) du virus de l'herpès, le promoteur immédiat du CMV, le promoteur PGK, le promoteur SV40, etc..

Dans un mode de réalisation préféré, le gène rapporteur est placé sous le 20 contrôle du promoteur du gène Rev-erb alpha, par exemple d'un promoteur comprenant la séquence non-codante de SEQ ID NO : 1.

Tout gène rapporteur peut être utilisé dans le procédé de criblage selon l'invention. Parmi ceux-ci, on peut citer par exemple le gène de la 25 chloramphénicol acétyltransférase (CAT), le gène de la luciférase de luciole (Luc) ou de Renilla (Ren), le gène de la phosphatase alcaline secrétée (PAS) ou celui de la bêta-galactosidase (β -Gal). L'activité des protéines codées par ces gènes peut être facilement mesurée par des méthodes classiques et permet de connaître indirectement l'effet des

récepteurs nucléaires sur l'expression des gènes en mesurant la quantité de protéines produites et/ou leur activité enzymatique. Le système rapporteur est avantageusement introduit dans une population de cellules, qui peut être d'origine procaryote ou eucaryote.

5

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un composé identifié, sélectionné, caractérisé ou optimisé selon un procédé décrit ci-avant pour la préparation d'un médicament destiné à la mise en œuvre d'une méthode de traitement thérapeutique ou vaccinal du corps humain ou animal, notamment au traitement curatif ou préventif de pathologies métaboliques, en particulier du diabète, de l'obésité, de l'insulino-résistance et du syndrome X.

10
15

Un autre objet de l'invention réside dans un procédé de préparation d'un médicament comprenant (i) une étape de sélection d'un composé capable de moduler la différenciation adipocytaire telle que décrite ci-avant et (ii) la mise en contact d'un composé sélectionné, ou d'un analogue de celui-ci, avec un véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique.

20
25

Un autre objet de l'invention réside dans un procédé de préparation d'un composé actif sur la différenciation adipocytaire, comprenant (i) une étape de sélection d'un composé capable de moduler la différenciation adipocytaire telle que décrite ci-avant et (ii) la synthèse d'un composé sélectionné, ou d'un analogue de celui-ci.

D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent et des dessins en annexe, fournis à titre illustratif et non limitatif, dans lesquels,

- la figure 1 illustre les résultats des analyses par Northern blot des ARNms extraits de tissus adipeux de rats traités ou non à la rosiglitazone (BRL):

Des rats mâles adultes ont été traités durant 14 jours soit avec de la rosiglitazone (10 mg/kg/jour) soit avec l' excipient (carboxyméthylcellulose 1%). Après sacrifice et dissection, l' ARN total a été extrait des tissus adipeux epididymal et perirénal. 10 µg d' ARNm ont été soumis à l' analyse par Northern blot en utilisant des sondes d' ADNc du récepteur *REV-ERB ALPHA* (panneau supérieur) ou de la β -actine (panneau inférieur).

- la figure 2 montre l' induction de l' expression de l' ARNm du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans les pré-adipocytes 3T3-L1 par la rosiglitazone (BRL).

Les pré-adipocytes 3T3-L1 se sont développés jusqu' à confluence dans un milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal. Une fois à confluence, les cellules ont été changées dans du DMEM avec 10% sérum de veau fœtal et stimulées avec un mélange contenant de l' IBMX, de la dexaméthasone, de l' insuline, avec ou sans rosiglitazone (1 μ M dans de l' H₂O) durant 9 jours. L' ARN a été isolé et analysé par Northern blot.

- la figure 3 illustre l' induction de l' activité du promoteur du gène Rev-erb alpha par la rosiglitazone (BRL) et le récepteur PPAR GAMMA.

Des pré-adipocytes 3T3-L1 ont été transfectés avec un plasmide qui comprend un fragment de 1,7 kb du promoteur du gène Rev-erb alpha cloné devant le gène reporteur luciférase et avec le plasmide pSG5-

PPAR gamma qui permet l' expression du récepteur PPAR GAMMA murin ou le vecteur vide pSG5 correspondant. Les cellules ont été traitées avec de la rosiglitazone (1 μ M) et les activités luciférase ont été mesurées comme décrit précédemment.

5

- la figure 4 illustre le rôle du site Rev-DR2 dans l' induction de l' activité du promoteur du gène Rev-erb alpha par le récepteur PPAR GAMMA.

10

– la figure 4A montre les effets du récepteur PPAR GAMMA sur l' activité d' une construction du promoteur humain du gène codant le récepteur *REV-ERB ALPHA* contenant un site sauvage ou muté Rev-DR2.

– la figure 4B montre les effets du récepteur PPAR GAMMA sur l' activité d' une construction du promoteur du gène du récepteur humain *REV-ERB ALPHA* contenant un site sauvage ou muté Rev-DR2 cloné en deux copies en amont du promoteur SV40.

15

Des cellules Cos ont été transfectées avec les constructions de reporteurs indiquées, et des plasmide pSG5-PPAR gamma ou pSG5. Les cellules ont été traitées avec de la rosiglitazone (BRL) et les activités luciférase ont été mesurées.

20

- la figure 5 illustre des tests de mesure de la mobilité électrophorétique du récepteur PPAR GAMMA qui se lie en tant qu' hétérodimère avec le récepteur nucléaire RXR ALPHA au site Rev-DR2 du promoteur du gène Rev-erb alpha.

Les tests de mesure de la mobilité électrophorétique ont été effectués en utilisant les oligonucléotides indiqués, marqués en leur extrémité, en présence des récepteurs PPAR GAMMA murin, RXR ALPHA murin, REV-ERB ALPHA humain produit par lysat de réticulocytes, ou de lysats non-

25

programmés (lysat). Les expériences de compétition de la liaison ont été effectuées en ajoutant un excès 0, 10 ou 100 fois de l' oligonucléotide Rev-DR2 froid.

5 - la figure 6 montre que l' expression exogène du récepteur *REV-ERB ALPHA* stimule l' accumulation lipidique dans les cellules 3T3-L1.

Des cellules 3T3-L1 ont été infectées avec un rétrovirus contrôle (MFG-Neo) ou avec un rétrovirus qui permet la sur-expression du récepteur 10 *REV-ERB ALPHA* (MFG-Rev-erb alpha). Les cellules résultantes ont été induites pour se différencier avec ou sans rosiglitazone (BRL) à 1 μ M durant huit jours. Les cellules ont ensuite été fixées et colorées avec de l' Oil red O.

- la figure 6A, C et D montre des vues au microscope des cellules 15 colorées à l' Oil red O.

- la figure 6B montre des vues macroscopiques des plaques colorées à l' Oil red O.

- la figure 6E montre l' expression exogène ou endogène de la protéine *REV-ERB ALPHA* (Ecto-Rev ou Endo-Rev) contrôlée par Western blot.

20 Un anticorps polyclonal de lapin anti- *REV-ERB ALPHA* dirigé contre un peptide synthétique (constituée par les acides aminées 263-365 de la séquence humaine) a été utilisé pour les expériences d' immunocytochimie et de Western blotting.

25 - la figure 7 illustre l' impact de l' expression exogène du récepteur *REV-ERB ALPHA* sur l' expression des ARNms du récepteur PPAR GAMMA et du gène aP2 utilisé comme marqueur de la différenciation adipocytaire. Des cellules 3T3-L1 ont été infectées soit avec le rétrovirus MFG-Neo soit avec le rétrovirus MFG-Rev et traitées durant 8 jours avec

un mélange contenant de l' IBMX et de l' insuline (noté Mix), avec ou sans rosiglitazone 1 μ M. Les ARNms ont ensuite été extraits et analysés par Northern blot à l' aide des sondes indiquées.

5 D' autres avantages et caractéristiques de l' invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent qui reflètent les travaux mis en œuvre par les inventeurs pour aboutir à la conception et à la mise en œuvre de la méthode de criblage.

10 1- MATERIELS ET METHODES

Matériels

La Rosiglitazone (Réf. BRL49653) est un échantillon fourni par A. Bril (SKB, Rennes, France), des cellules GP+ E86 (Columbia University, New York, U.S.A.) et le plasmide pMFG (Massachusetts Institut of Technology, Cambridge, U.S.A.).

Animaux

Des rats Sprague-Dawley mâles (âgés de 10 semaines) ont été traités 20 durant 14 jours par gavage avec de la rosiglitazone (10 mg/kg/j) en suspension dans du 1% carboxyméthylcellulose. Les animaux contrôle ont reçu un volume équivalent (5 ml/kg/j) de la solution de carboxyméthylcellulose. A la fin des expériences, les animaux sont sacrifiés sous anesthésie à l' éther. Le tissu adipeux est retiré 25 immédiatement et congelé dans de l' azote liquide.

Analyse d' ARN.

L' extraction de l' ARN et les analyses par Northern blot ont été effectuées selon le protocole décrit précédemment (Staels, B. et al. 1192,

Arterioesclerosis and Thrombosis 12(3), 286-294) en utilisant des sondes ADNC Rev-erb alpha de rat, PPAR gamma et aP2 murins, beta-actine de poulet ou 36B4 humain.

5 Expériences de transfection.

Les constructions qui comprennent des fragments du promoteur du gène Rev-erb alpha clonés dans le plasmide sans promoteur pGL2 ou le plasmide SV40pGL2 (Promega, Madison, WI, U.S.A.) ont été décrits précédemment (Adelman, G. et al. 1996, Proc.natl Acad Sci.USA, 93(8), 10 3553-3558). Les cellules humaines d' hepatome HepG2 ont été obtenues de la Collection Européenne de culture de cellules animales (Porton Down, Salisbury, UK) et les cellules 3T3-L1 ont été obtenues de l' American Type Cell Culture (ATCC). Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM, supplémenté avec 2 mM glutamine et 10% (vol/vol) de sérum de 15 veau fœtal (SVF), dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂ à 37°C. Toutes les transfections ont été effectuées en triplicata. Les activités luciférase ont été déterminées sur les extraits cellulaires totaux en utilisant un système de test de luciférase (Promega, Madison, WI, U.S.A.).

20 Traduction *in vitro* et EMSAs.

Les plasmides pSG5-mPPAR gamma, pSG5-mRXR alpha et pSG5-hRev-erb alpha ont été transcrits *in vitro* avec la polymérase T7 et traduits en utilisant le système de lysats de réticulocytes de lapin (Promega, Madison, WI, U.S.A.). Les expériences de retard sur gel avec les protéines *REV-ERB ALPHA*, PPAR GAMMA et/ou RXR ALPHA ont été effectués comme décrit préalablement (Gervois, P. et al. 1999, Molecular Endocrinology 13(3), 400-409) et Vu-Dac, N. et al. 1994, J.Biol.Chem. 269(49), 31012-25 31018). Pour les expériences de compétition, des quantités croissantes de la sonde froide indiquée ont été ajoutées immédiatement avant l' ajout de

l' oligonucléotide marqué. Les complexes ont été résolus dans des gels de polyacrylamide à 5%, dans un tampon 0,25 X TBE (90 mM borate, 2,5 mM EDTA, pH 8,3) à température ambiante. Les gels ont été séchés et exposés pendant la nuit à - 70°C sur un film de Rayon-X (XOMAT-AR, Eastman 5 Kodak, Rochester, NY, U.S.A.).

Production virale et infection.

Les cellules encapsulant le virus GP+ E86 (Markowitz, D. et al. 1988, J. Virol. 62(4), 1120-1124) sont cultivées dans du milieu DMEM (4,5 g/l glucose) contenant 10% de sérum de veau inactivé par la chaleur (HyClone, Logan, UT, USA), 8 µg/ml de gentamicine, 50 U/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine, à 37°C dans une atmosphère contenant 5% CO₂ et 95% d' air humidifié.

De manière à générer des lignées cellulaires qui de manière constitutive sur-expriment le récepteur *REV-ERB ALPHA*, la séquence codant pour le récepteur *REV-ERB ALPHA* a été insérée en amont du site d' entrée du ribosome interne et du gène de résistance à la néomycine pCITE, (Novagen, Madison, WI, USA) du plasmide retroviral MFG (Dranoff, G. et al. 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90(8), 3539-3543) en utilisant 20 les sites NcoI-BamHI pour générer le plasmide pMFG- Rev-erb alpha.

Une construction similaire où la séquence codant pour le récepteur *REV-ERB ALPHA* est absente est utilisé tout au long de l' étude comme contrôle (pMFG-Neo).

La construction bicistronique est conçue pour permettre l' expression 25 simultanée du récepteur *REV-ERB ALPHA* et du produit du gène de la résistance à la néomycine des cellules infectées. Pour produire les virus recombinants, les cellules GP+ E86 (15 000/cm²) sont transfectées avec les constructions des plasmides MFG (2µg) en utilisant la lipofectamine (Life Technologies-Invitrogen, Groeningen, The Netherlands) et en

sélectionnant les résistants en utilisant l' analogue de la génétidine G418 (0,8 mg/ml, Life Technologies-Invitrogen, Groeningen, The Netherlands). Les cellules 3T3-L1 ont été infectées avec les virus MFG-Neo ou MFG-Rev-erb alpha produits par GP+ E86 comme décrit (Mattot, V. et al. 2000, 5 Oncogene, 19(6) 762-772) et sélectionnés pour leur résistance à la génétidine jusqu' à l' établissement de lignées stables (approximativement 10 jours).

Culture cellulaire et différenciation.

10 Les cellules 3T3-L1 (obtenues de l' ATCC) sont cultivées dans un milieu de culture de croissance contenant du DMEM et 10% de sérum de veau fœtal. Les cellules sont différencierées par la méthode de Bernlohr et al. (Bernlohr, D.A. et al. 1984, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 81(17), 5468-5472). Des cellules post-confluentes après deux jours de culture (désigné comme 15 jour J0) sont transférées dans un milieu de différenciation (DMEM, 10% SVF, 1 µm dexaméthasone, 10 µg/ml insuline et 0,5 mM 3-méthyl-1-isobutylxanthine (IBMX)(Sigma, St Louis, MI, USA)) pendant deux jours. Ensuite les cellules ont été cultivées dans un milieu de post-différenciation 20 (DMEM ; 10% SVF, insuline) avec ou sans rosiglitazone. Le milieu est changé chaque jour. Des pré-adipocytes 3T3-L1 stables exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA* sont cultivés dans les mêmes conditions mais différencierés sans dexaméthasone. Après le traitement, les cellules ont été fixées avec 10% formaldéhyde dans du PBS et colorés avec de l' Oil Red O (Sigma, St Louis, MI, USA). Alternativement, l' ARN total est extrait 25 comme décrit ci-dessus.

RESULTATS

L' activation du récepteur PPAR GAMMA augmente l' expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans le tissu adipeux du rat.

Afin de déterminer si l' activation par le récepteur PPAR GAMMA a une incidence sur l' expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* in vivo, des rats ont été traités avec de la rosiglitazone (notée BRL), un ligand actif et hautement spécifique du récepteur PPAR GAMMA durant 14 jours.

5 L' expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* a été analysée dans les tissus adipeux épididymal et périnéal par Northern blot. Comparé avec le contrôle, le traitement avec la rosiglitazone augmente fortement les niveaux d' ARNm codant pour le récepteur *REV-ERB ALPHA* dans les tissus adipeux étudiés (Figure 1). Les niveaux d' ARNm de la beta-actine 10 utilisés comme contrôle ne sont pas affectés par le traitement. Ces expériences démontrent que l' activation du récepteur PPAR GAMMA par la rosiglitazone augmente l' expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans le tissu adipeux.

15 L' activation du récepteur PPAR GAMMA induit l' ARNm du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans les pré-adipocytes 3T3-L1.

Afin d' étudier le mécanisme moléculaire de cette induction, les inventeurs ont étudié la régulation de l' expression de l' ARNm du récepteur *REV-ERB ALPHA* par la rosiglitazone dans les pré-adipocytes 20 3T3-L1 (Figure 2). Des pré-adipocytes 3T3-L1 ont été cultivés jusqu' à confluence dans un milieu contenant 10% de sérum de veau fœtal. Les cellules confluentes ont été transférées dans un milieu contenant du sérum délipidé et les cellules ont été différencierées avec un mélange contenant de la dexaméthasone, de l' IBMX, de l' insuline, avec ou sans rosiglitazone 25 (1 μ m).

Les niveaux de l' ARNm codant pour le récepteur *REV-ERB ALPHA* augmentent au fur et à mesure de la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes. Cependant, comparés avec le traitement standard de différenciation, les niveaux d' ARNm codant pour le récepteur *REV-ERB*

ALPHA son induits plus précocement lorsque la rosiglitazone est ajoutée. Ces niveaux étaient significativement plus élevés après 9 jours dans des adipocytes 3T3-L1 complètement différenciés.

5 Utilisés comme contrôle, les niveaux de l' ARNm de la beta-actine ont faiblement changé durant l' adipogenèse et ne sont pas affectés par le traitement avec la rosiglitazone.

Le récepteur PPAR GAMMA induit l' expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* au niveau transcriptionnel.

10

Afin d' élucider si l' induction de l' ARNm du récepteur *REV-ERB ALPHA* se produit au niveau transcriptionnel, les inventeurs ont testé les effets de la sur-expression du récepteur PPAR GAMMA et de la stimulation par la rosiglitazone sur l' activité transcriptionnelle d' une 15 construction comportant un gène rapporteur de luciférase sous le contrôle d' un fragment de 1,7 kb du promoteur du gène Rev-erb alpha.

Des cellules 3T3-L1 ont été transfectées avec la construction comportant le gène rapporteur de luciférase sous le contrôle d' un fragment de 1,7 kb 20 du promoteur du gène Rev-erb alpha en présence du vecteur d' expression pSG5-PPAR gamma qui permet l' expression du récepteur PPAR GAMMA murin ou du vecteur vide pSG5 correspondant et traitées avec de la rosiglitazone ou l' excipient.

L' activité du promoteur du gène Rev-erb alpha est induite par la sur-expression du récepteur PPAR GAMMA, un effet qui est par ailleurs 25 amplifié en présence de rosiglitazone (Figure 3). Par contre, lorsque la construction comportant le gène rapporteur de luciférase sous le contrôle d' un fragment de 1,7 kb du promoteur du gène Rev-erb alpha est transfectée seule, aucun effet n' est observé. Ces données indiquent que

la transcription du gène Rev-erb alpha est induite par la rosiglitazone via l' activation du récepteur PPAR gamma.

Un élément, nommé Rev-DR2, qui présente une forte homologie, avec un élément de réponse de type « DR2 » d' un récepteur nucléaire a été 5 identifié dans le promoteur du gène Rev-erb alpha. Il a été montré que, ledit récepteur *REV-ERB ALPHA* se lie sur ce site et réprime sa propre transcription via celui-ci (Adelman, G. et al, 1996, Proc.Natl.Acad.Sci, 93(8), 3553-3558). Celui-ci a par ailleurs été identifié comme étant l' élément de réponse sur lequel l' hétérodimère PPAR alpha/RXR ALPHA 10 se fixe pour conférer une réponse aux fibrates au gène Rev-erb alpha dans le foie (Gervois et al., Mol. Endocrinol., 13, 400-409, 1999).

Pour confirmer que le site Rev-DR2 peut également fonctionner comme un élément de réponse du récepteur PPAR GAMMA dans le tissu adipeux, les inventeurs ont effectué des expériences de transfections transitoires en 15 utilisant des constructions comprenant les versions sauvages et tronquées du promoteur du gène Rev-erb alpha notées pGL2-hRev-erb $\alpha\delta$ et pGL2- hRev-erb $\alpha\Delta$ décrites précédemment (Adelman, G. et al, 1996, Proc.Natl.Acad.Sci, 93(8), 3553-3558) (Figure 4). Pour confirmer que le site Rev-DR2 peut également fonctionner comme un élément de réponse 20 du récepteur PPAR GAMMA dans le tissu adipeux, les inventeurs ont également effectué des expériences de transfections transitoires en utilisant des constructions décrites précédemment (Adelman, G. et al, 1996, Proc.Natl.Acad.Sci, 93(8), 3553-3558) comprenant les versions sauvages et mutées du site Rev-DR2 clonées en amont du promoteur SV40 25 (Rev-DR2, Rev-DR2M5' et Rev-DR2M3') (Figure 4). La cotransfection dans les cellules HepG2 d' un vecteur d' expression du récepteur PPAR GAMMA et d' un vecteur rapporteur qui comporte deux copies du site Rev-DR2 sauvage clonées en amont du promoteur SV40 et du gène rapporteur lucifèrase conduit à une induction améliorée d' un facteur 2,5

de l' activité transcriptionnelle par rapport au niveau obtenu avec le vecteur d' expression pSG5 vide. Par contre, aucun effet n' est observé lorsque le vecteur rapporteur utilisé comporte deux copies du site Rev-DR2 muté soit en position 3' , soit en position 5' . L' effet de la sur-expression du récepteur PPAR GAMMA est amplifié en présence de rosiglitazone. Ces résultats montrent clairement que l' activité du promoteur du gène Rev-erb alpha est régulée par le récepteur PPAR GAMMA et que cette induction est effectuée via le site Rev-DR2 (Figure 4).

10

Le récepteur PPAR GAMMA se lie en tant qu' hétérodimère avec le récepteur RXR ALPHA au site Rev-DR2.

Enfin il a été recherché si le récepteur PPAR GAMMA se lie sur le site Rev-DR2. Un test de mesure de l' électromobilité (retard sur gel ou EMSAs) a été effectué en utilisant les protéines PPAR GAMMA et RXR ALPHA synthétisées in vitro. Comme contrôle, le récepteur *REV-ERB ALPHA* produit in vitro se lie au site Rev-DR2 sauvage aussi bien comme monomère que comme homodimère (Figure 5). Par contre on n' observe pas de liaison sur l' oligonucléotide Rev-DR2 portant une mutation sur le demi-site AGGTCA situé en 5' (M5') tel que décrit précédemment (Adelman, G. et al, 1996, Proc.Natl.Acad.Sci, 93(8), 3553-3558). Enfin, le récepteur *REV-ERB ALPHA* se lie en tant que monomère au site Rev-DR2 portant une mutation sur le demi-site AGGTCA situé en 3' (M3') tel que décrit précédemment (Adelman, G. et al, 1996, Proc.Natl.Acad.Sci, 93(8), 3553-3558). Les récepteurs RXR ALPHA ou PPAR GAMMA seuls ne se lient à aucun des oligonucléotides indiquant que PPAR GAMMA et RXR ALPHA ne peuvent pas se lier en tant que monomères. La liaison au site Rev-DR2 a été observée lorsque le récepteur PPAR GAMMA est incubé avec le récepteur RXR ALPHA. La liaison est spécifique puisqu' une

compétition est établie avec un excès d' oligonucléotide non-marqué. Par contre, aucune liaison du complexe PPAR GAMMA/RXR ALPHA n' est observée sur le site Rev-DR2 muté (M5' ou M3'). Ces expériences de liaison démontrent que PPAR GAMMA se lie en tant qu' hétérodimère avec RXR ALPHA au site Rev-DR2 intact du promoteur du gène Rev-erb alpha.

Le récepteur *REV-ERB ALPHA* augmente l' activité adipogénique du récepteur PPAR GAMMA.

10 Afin de confirmer directement la participation du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans l' adipogenèse, la totalité du cDNA codant pour le récepteur *REV-ERB ALPHA* a été clonée dans un vecteur retroviral. Des pré-adipocytes 3T3-L1 ont ensuite été infectés avec le virus résultant. Des lignées stables établies par sélection en présence de l' antibiotique G418 (Néomycine) après infection soit avec le virus MFG-Neo (contrôle négatif), soit avec le virus MFG- Rev-erb alpha, sont mises en culture jusqu' à confluence et ultérieurement traitées avec un milieu de différenciation (noté Mix) contenant de l' IBMX, de l' insuline avec ou sans rosiglitazone notée BRL (1 μ M). L' expression endogène ou induite par infection virale de *REV-ERB ALPHA* a été vérifiée par des analyses immunocytochimiques ou par Western blot (Figure 6E). Les cellules infectées par MFG-Neo expriment des niveaux élevés de récepteur *REV-ERB ALPHA* par comparaison aux cellules contrôle infectées avec MFG-Neo.

20 En absence de rosiglitazone, l' expression exogène du récepteur *REV-ERB ALPHA* induit seulement une faible différenciation morphologique des pré-adipocytes. En présence de rosiglitazone (1 μ M), on observe une augmentation de la différenciation des pré-adipocytes et de l' accumulation lipidique dans les cellules exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA*, par rapport aux cellules contrôles. En effet, après fixation et

coloration avec du " Oil red O " , une faible accumulation de lipides est observée en absence de rosiglitazone, mais une forte accumulation lipidique est observée dans les cellules exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA* traitées avec de la rosiglitazone durant 8 jours (Figures 6A - 6D).

5 Pour obtenir le même résultat avec de la rosiglitazone seule sans stimulation hormonale, les cellules doivent être différenciées durant 16 jours (données non montrées).

Ces changements morphologiques se produisent en parallèle avec une variation similaire de l' ARNm des marqueurs spécifiques des adipocytes.

10 Les analyses par Northern blot montrent un niveau d' expression du récepteur PPAR GAMMA, et d' aP2 faible mais significatif dans les cellules exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA* (Figure 7).

De manière surprenante, le niveau endogène du récepteur *REV-ERB ALPHA* est perturbé dans les cellules sur-exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA*.

15 Les niveaux d' ARNm d' aP2 et de récepteur PPAR GAMMA sont élevés dans les cellules exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA* traitées avec un mélange de rosiglitazone après seulement 4 jours de différenciation (Figure 7), ou avec de la rosiglitazone seule (Figure 7). Ce phénomène n' est observé qu' après 8-12 jours dans les cellules 20 contrôle. Ces résultats montrent que l' expression exogène de récepteur *REV-ERB ALPHA* produit un faible effet sans la stimulation hormonale et amplifie l' induction de l' adipogenèse par l' activation par le ligand PPAR GAMMA.

25 C' est ainsi que l' utilisation de la lignée des cellules pré-adipocytaires de l' invention, sur-exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA* a permis l' identification du gène Rev-erb alpha comme un nouveau gène cible pour le récepteur PPAR GAMMA dans la cascade adipogénique des facteurs de transcription. Cette constatation du rôle actif du récepteur *REV-ERB*

ALPHA dans le processus de différenciation adipocytaire a permis aux inventeurs de mettre en oeuvre une nouvelle méthode de criblage pour identifier des composés actifs intervenant dans la modulation adipocytaire.

REVENDICATIONS

1. Cellule pré-adipocytaire génétiquement modifiée, caractérisée en ce qu' elle comprend un acide nucléique recombinant codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*.
5
2. Cellule selon la revendication 1, caractérisée en ce que le récepteur *REV-ERB ALPHA* comprend la séquence SEQ ID NO :4 ou un fragment ou variant fonctionnel de celle-ci.
10
3. Cellule selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que l' acide nucléique recombinant comprend la séquence SEQ ID NO : 3 ou un fragment de celle-ci.
15
4. Cellule selon l' une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l' acide nucléique recombinant comprend en outre la séquence SEQ ID NO : 1 ou un fragment de celle-ci comprenant la séquence SEQ ID NO :2.
20
5. Cellule selon l' une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l' acide nucléique recombinant est incorporé dans un vecteur plasmidique.
25
6. Cellule selon l' une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l' acide nucléique recombinant est incorporé dans un vecteur viral.
7. Cellule selon l' une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l' acide nucléique recombinant est intégré dans le génome de la cellule.
8. Procédé de préparation d' une cellule pré-adipocytaire selon l' une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l' on introduit dans une cellule

de pré-adipocyte un acide nucléique recombinant codant un récepteur REV ERB ALPHA.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que les pré-
5 adipocytes sont choisis parmi les lignées cellulaires 3T3-L1, 3T3-F442A,
ob17 et ob1771.

10. Procédé selon l' une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que
l' acide nucléique est introduit par transfection au moyen d' un vecteur
10 plasmidique.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu' il comprend
la cotransfection des cellules avec un vecteur plasmidique comprenant
le dit acide nucléique recombinant et un vecteur plasmidique comportant un
15 gène de résistance à un antibiotique, et en ce que les cellules sont
sélectionnées pour leur résistance audit antibiotique et pour leur
expression dudit acide nucléique recombinant.

12. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l' acide
20 nucléique est introduit par transfection au moyen d' un vecteur
plasmidique comportant en outre un gène de résistance à un antibiotique,
et en ce que les cellules sont sélectionnées pour leur résistance audit
antibiotique et pour leur expression de l' acide nucléique recombinant.

25 13. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l' acide
nucléique est introduit par transfection au moyen d' un vecteur
plasmidique comportant en outre un gène de résistance à un antibiotique et
une origine de réplication eucaryote, et en ce que les cellules sont

sélectionnées pour leur résistance audit antibiotique et pour leur expression de l' acide nucléique recombinant.

14. Procédé selon l' une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que
5 l' acide nucléique est introduit par infection au moyen d' un vecteur viral.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l' infection
est effectuée au moyen d' un adénovirus ou d' un rétrovirus recombinant.

10 16. Procédé selon l' une quelconque des revendications 8 à 15,
caractérisé en ce que l' acide nucléique recombinant comprend la SEQ ID
No : 3 ou un fragment de celle-ci.

17. Procédé selon l' une quelconque des revendications 8 à 16,
15 caractérisé en ce que l' acide nucléique recombinant comprend en outre
une ou des régions de régulation de la transcription, typiquement un
promoteur et/ou un terminator transcriptionnel.

18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que l' acide
20 nucléique recombinant comprend la séquence SEQ ID NO : 1 ou un
fragment de celle-ci comprenant la séquence SEQ ID NO :2.

19. Procédé selon l' une quelconque des revendications 8 à 18,
caractérisé en ce que, après l' infection ou la transfection, on sélectionne
25 les lignées stables de pré-adipocytes en culture.

20. Méthode d' identification de composés capables de moduler la
différenciation adipocytaire, caractérisée en ce que (i) on met en contact
un composé à tester avec une population de cellules pré-adipocytaires

selon l' une des revendications 1 à 7, (ii) on mesure ou on détermine la différenciation adipocytaire desdites cellules et (iii), de préférence, on compare cette différenciation à la différenciation adipocytaire des mêmes dites cellules pré-adipocytaire en l' absence dudit composé à tester.

5

21. Méthode selon la revendication 20, caractérisée en ce que le composé à tester est mis en contact avec des cellules sur-exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA* en présence ou en absence d' au moins un activateur d' un récepteur impliqué dans le processus de différenciation adipocytaire.

10

22. Méthode selon la revendication 21, caractérisée en ce que l' activateur du récepteur impliqué dans le processus de différenciation adipocytaire est un activateur du récepteur PPAR GAMMA.

15

23. Méthode selon la revendication 22, caractérisée en ce que l' activateur du récepteur impliqué dans le processus de différenciation adipocytaire est choisi dans le groupe comprenant notamment : les thiazolidinediones, telles que rosiglitazone, troglitazone, englitazone, ciglitazone, pioglitazone, ou KRP-297, les N-(2-benzoylphenyl)-L-tyrosines et la 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandine J2.

20

24. Méthode selon la revendication 20, caractérisée en ce que l' on met en contact le composé à tester avec les cellules pré-adipocytaires définies dans l' une des revendications 1 à 7 en présence ou en absence d' au moins un activateur d' un gène impliqué dans le processus de différenciation adipocytaire.

25. Méthode selon la revendication 24, caractérisée en ce que l' activateur d' un gène impliqué dans le processus de différenciation adipocytaire est un activateur du gène PPAR gamma.

5 26. Méthode selon la revendication 25, caractérisée en ce que l' activateur du gène PPAR gamma est choisi dans le groupe comprenant C/EBP beta, C/EBP delta et ADD1 (SREBP1c).

10 27. Méthode selon l' une quelconque des revendications 20 à 26, caractérisée en ce que la mesure de la différenciation adipocytaire est réalisée (i) par coloration des cellules différenciées, de préférence avec un colorant choisi parmi le colorant Oil Red O et Sudan Black, (ii) par détermination du transport ou de la synthèse d' acide gras, et/ou (iii) par détermination de l' expression d' au moins un marqueur spécifique des 15 adipocytes différenciés, de préférence d' un marqueur choisi parmi aP2, adipsine et leptin.

20 28. Méthode d' identification de composés capables de moduler la différenciation adipocytaire, caractérisée en ce qu' elle comprend (i) la mise en contact d'un composé test et d'un acide nucléique comprenant la séquence SEQ ID NO : 2 ou un équivalent fonctionnel de celle-ci, en présence de récepteur PPAR GAMMA, (ii) la mise en évidence d'une liaison du récepteur PPAR GAMMA sur cet acide nucléique et, éventuellement, (iii) la comparaison de cette liaison à celle observée en 25 l'absence de composé test, les composés test modulant la liaison du récepteur PPAR GAMMA étant des composés modulant la différenciation adipocytaire.

25. Méthode selon la revendication 24, caractérisée en ce que l'activateur d'un gène impliqué dans le processus de différenciation adipocytaire est un activateur du gène PPAR gamma.

5 26. Méthode selon la revendication 25, caractérisée en ce que l'activateur du gène PPAR gamma est choisi dans le groupe comprenant C/EBP beta, C/EBP delta et ADD1 (SREBP1c).

10 27. Méthode selon l'une quelconque des revendications 20 à 26, caractérisée en ce que la mesure de la différenciation adipocytaire est réalisée (i) par coloration des cellules différenciées, de préférence avec un colorant choisi parmi le colorant Oil Red O et Sudan Black, (ii) par détermination du transport ou de la synthèse d'acide gras, et/ou (iii) par détermination de l'expression d'au moins un marqueur spécifique des 15 adipocytes différenciés, de préférence d'un marqueur choisi parmi aP2, adip sine et leptin.

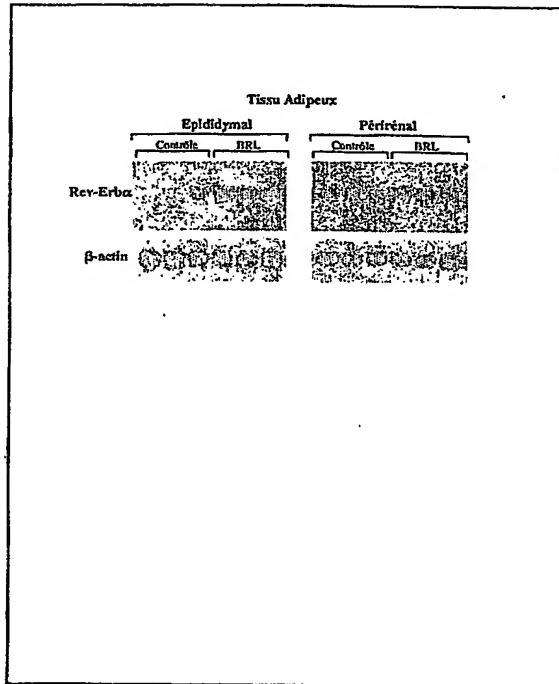
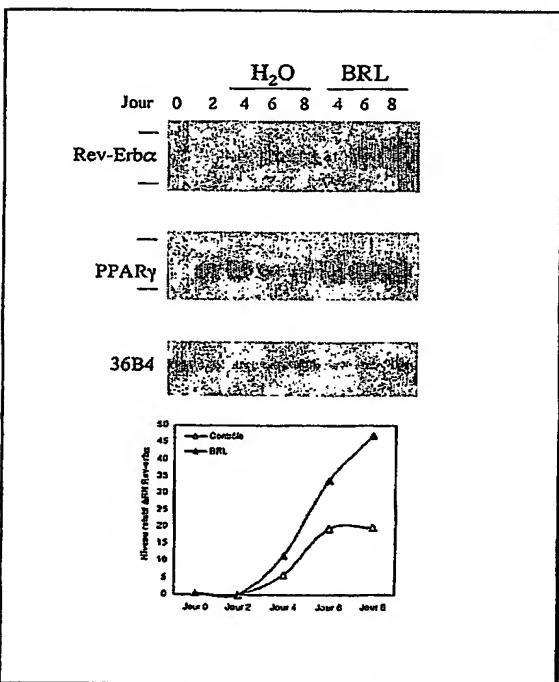
20 28. Virus recombinant défectif, de préférence un adénovirus ou un rétrovirus recombinant défectif, caractérisé en ce qu'il comprend dans son génome un acide nucléique codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*.

29. Méthode d' identification de composés capables de moduler la différenciation adipocytaire, caractérisée en ce qu' elle comprend la mise en contact d' un composé test et du récepteur PPAR GAMMA avec un système rapporteur comprenant (i) un promoteur transcriptionnel 5 comprenant une ou plusieurs copies de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un variant fonctionnel de celle-ci et (ii) un gène rapporteur, et l'évaluation de l'activité du composé test par mesure de son effet sur l'expression du gène rapporteur induite par le récepteur PPAR GAMMA.

10 30. Utilisation d' un composé identifié par une méthode selon l' une des revendications 20 à 29, ou d' un analogue de celui-ci, pour la préparation d' un médicament destiné au traitement préventif ou curatif d' une maladie métabolique.

15 31. Utilisation d' un composé identifié par une méthode selon l' une des revendications 20 à 29, ou d' un analogue de celui-ci, pour la préparation d' un médicament destiné au traitement préventif ou curatif du diabète, de l' obésité, de l' insulino-résistance et du syndrome X.

20 32. Virus recombinant défectif, de préférence un adénovirus ou un rétrovirus recombinant défectif, caractérisé en ce qu' il comprend dans son génome un acide nucléique codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*.

**Figure 1****Figure 2**

2/4

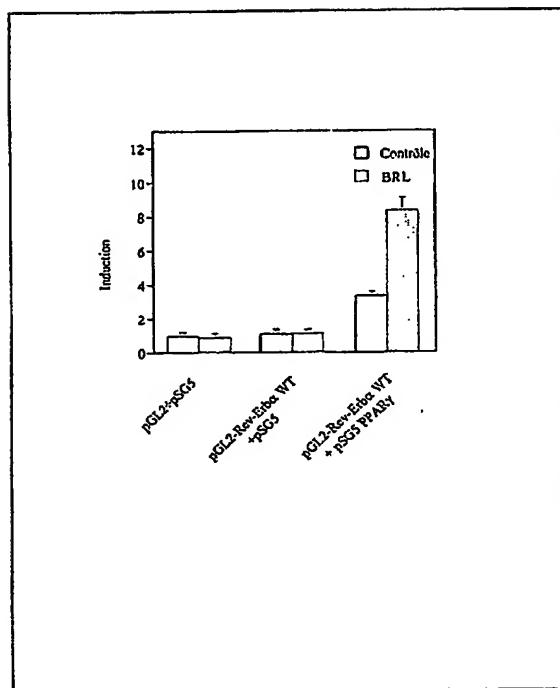


Figure 3

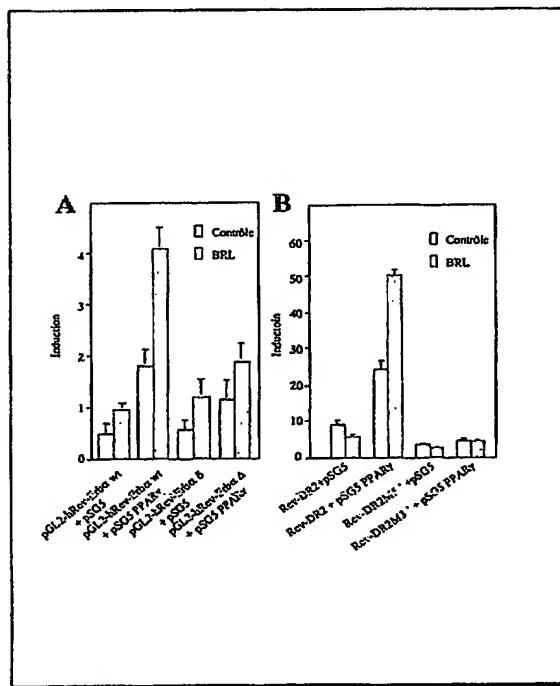


Figure 4

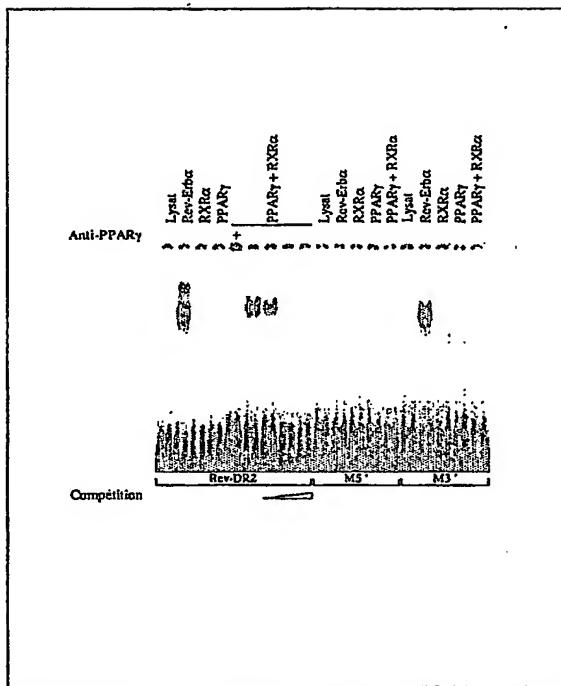


Figure 5



Figure 6

4/4

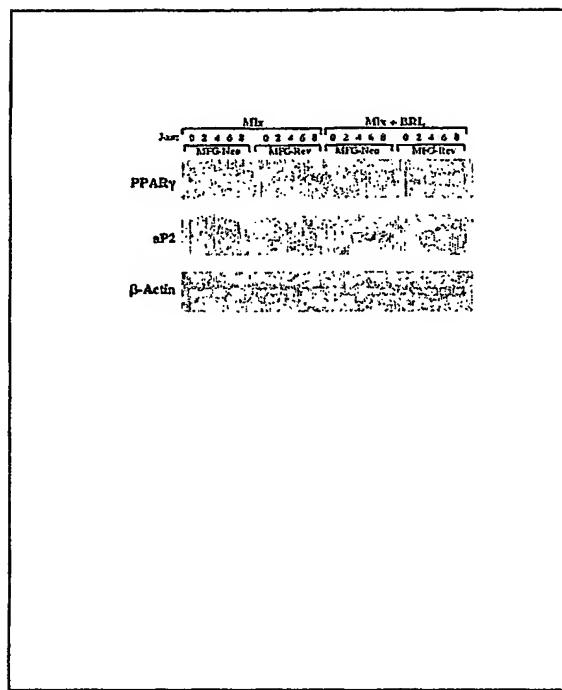


Figure 7

LISTE DE SEQUENCES

<110> GENFIT SA

<120> Methode d'identification de substances capables de moduler la differentiation adipocytaire

<130> B0097FR

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1999

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

gaattcatgc tgcctgtgga gaagggttcc ctatgtgaag aaaaccctct ctagaagcac 60
tgggactggg gaggaattag cgggagcagc aggtggctca ggctccctct cccttcgctg 120
cctaagaagc ttccatcccc tccatgaccc aagccctcta acatgataga tctcctctac 180
ttgagatctg ttattactca tgggacagtt gctgctctga agcgaataac tggctgttt 240
ttgtttgttt gttttggaga cagagtctca ctctatcccc agggcggagt gcaatggcga 300
tctcggtctca ctgcaacccctc cacctcccg gttctagcga ttctcctgccc tcagcctcct 360
gactagctgg gattacaggc acccaccacc acatccggct aattttgtta ttttagtag 420
agacgtgggtt tcaccgtgtt ggtcaggctg gtctcaaact cctgacctca ggtgatcaac 480
ccacccctcagc ctcacaaagt gctgggattt caggcatgag ccaaagcacc cggcaatgct 540
ggctgtttctt aaccctgtttt cagtatttca cttgtacatc taccacccctt cccattcggg 600
gtgggcagat gaaactagca atggacgtct gaccttgggtt cggtcacttc tccataagctt 660
cctgttcccc actagtaaaa agaggggaggc ttaagatgtat ctacatgttc ccctctgagtt 720
agtaatcttc tgtgaatttcc atattttatc ctccagcacc gagggggcagg ggtgtcactc 780
tgccccccacc ccctgcctca cctcttcccc attacttttag gacctcaaag cactttcact 840
attagttccc ctctgttgc ctttttatcc cccagacaaa gggaaatgac tcaccccaaa 900
gtcaactgga gtgggtggaa tggtgtcaat acaagcaaac agggagttccc tacagacatc 960
cctacctctg tgggaacttcc ttcccttggaa ggtgttctcc ctaaggcgag tagaaggggaa 1020
aggggggtcac atttcctttc cttctcttggaa ctttgcctcg aagcagaggg cagcctaagc 1080
tcctgactcc agggaaatct ccctcccccc cttctctctc tcccggtcac cagtaacccctc 1140
aggacgaggt cagtcctgca atcacgtgaa gcccacgtt ttgcaaggtt tgcaagaaagg 1200
gcctcttagc tttgatctcc cagacagcaa acaagcttc cagtcctcc ccagaaattc 1260
acatgccccctt gccatacagg ctttctaaac acgcccacccct gactcttcag cgaccccccac 1320
cccacccac tctcagtc tcccagggtcc cggcaagcgc tttgccaggc agaaaggggaa 1380
aaggcacgca gtcccccac tttgtcggtt gactacaaat cccgacagtc ttgtcggttc 1440
gcaggcgcgc aagagctcaa cgtgcccggct gttggaaaag tttgtcggttc gggcaccgag 1500
gctccctg ggatcacatg gtacctgctc cagtggcccg tgcggcccccgg gaaccctggg 1560

ctgctggcgc ctgcgcagag ccctctgtcc cagggaaagg ctcgggcaaa aggccgctga 1620
 gattggcaga gtgaaatatt actgccgagg gaacgtgca gggcacacgt ctgcctctt 1680
 tgcgactcgg tgccccgtt ctccccatca cctacttact tcctggttgc aacctctttt 1740
 cctctgggac ttttgcacccg ggagctccag attcgctacc ccgcagcgct gcggagccgg 1800
 cagggcagagg cacccgtac actgcagaga cccgaccctc cttgctacct tctagccaga 1860
 actactgcag gctgattccc cctacacact ctctctgctc ttcccatgca aagcagaact 1920
 ccgttgcctc aacgttcaac ccttctgcag ggctgcagtc cggccacccc aagaccttgc 1980
 tgcagggtgc ttcggatcc 1999

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Rev-DR2

<400> 2

aaaagtgtgt cactggggca

20

<210> 3

<211> 1845

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1845)

<223> REV ERB ALPHA

<400> 3

atg acg acc ctg gac tcc aac aac aac aca ggt ggc gtc atc acc tac 48
 Met Thr Thr Leu Asp Ser Asn Asn Asn Thr Gly Gly Val Ile Thr Tyr
 1 5 10 15

att ggc tcc agt ggc tcc tcc cca agc cgc acc agc cct gaa tcc ctc 96
 Ile Gly Ser Ser Gly Ser Ser Pro Ser Arg Thr Ser Pro Glu Ser Leu
 20 25 30

tat agt gac aac tcc aat ggc agc ttc cag tcc ctg acc caa ggc tgt 144
 Tyr Ser Asp Asn Ser Asn Gly Ser Phe Gln Ser Leu Thr Gln Gly Cys
 35 40 45

ccc acc tac ttc cca cca tcc ccc act ggc tcc ctc acc caa gac ccg 192
 Pro Thr Tyr Phe Pro Pro Ser Pro Thr Gly Ser Leu Thr Gln Asp Pro
 50 55 60

gct cgc tcc ttt ggg agc att cca ccc agc ctg agt gat gac ggc tcc	240
Ala Arg Ser Phe Gly Ser Ile Pro Pro Ser Leu Ser Asp Asp Gly Ser	
65 70 75 80	
cct tct tcc tca tct tcc tcg tca tcc tcc tcc tcc tat aat	288
Pro Ser Phe Tyr Asn	
85 90 95	
ggg agc ccc cct ggg agt cta caa gtg gcc atg gag gac agc agc cga	336
Gly Ser Pro Pro Gly Ser Leu Gln Val Ala Met Glu Asp Ser Ser Arg	
100 105 110	
gtg tcc ccc agc aag agc acc agc aac atc acc aag ctg aat ggc atg	384
Val Ser Pro Ser Lys Ser Thr Ser Asn Ile Thr Lys Leu Asn Gly Met	
115 120 125	
gtg tta ctg tgt aaa gtg tgt ggg gac gtt gcc tcg ggc ttc cac tac	432
Val Leu Leu Cys Lys Val Cys Gly Asp Val Ala Ser Gly Phe His Tyr	
130 135 140	
ggt gtg cac gcc tgc gag ggc tgc aag ggc ttt ttc cgt cgg agc atc	480
Gly Val His Ala Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Ile	
145 150 155 160	
cag cag aac atc cag tac aaa agg tgt ctg aag aat gag aat tgc tcc	528
Gln Gln Asn Ile Gln Tyr Lys Arg Cys Leu Lys Asn Glu Asn Cys Ser	
165 170 175	
atc gtc cgc atc aat cgc aac cgc tgc cag caa tgt cgc ttc aag aag	576
Ile Val Arg Ile Asn Arg Asn Arg Cys Gln Gln Cys Arg Phe Lys Lys	
180 185 190	
tgt ctc tct gtg ggc atg tct cga gac gct gtg cgt ttt ggg cgc atc	624
Cys Leu Ser Val Gly Met Ser Arg Asp Ala Val Arg Phe Gly Arg Ile	
195 200 205	
ccc aaa cga gag aag cag cgg atg ctt gct gag atg cag agt gcc atg	672
Pro Lys Arg Glu Lys Gln Arg Met Leu Ala Glu Met Gln Ser Ala Met	
210 215 220	
aac ctg gcc aac aac cag ttg agc agc cag tgc ccg ctg gag act tca	720
Asn Leu Ala Asn Asn Gln Leu Ser Ser Gln Cys Pro Leu Glu Thr Ser	
225 230 235 240	
ccc acc cag cac ccc acc cca ggc ccc atg ggc ccc tcg cca ccc cct	768
Pro Thr Gln His Pro Thr Pro Gly Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Pro	
245 250 255	

gct ccg gtc ccc tca ccc ctg gtg ggc ttc tcc cag ttt cca caa cag	260	265	270	816
Ala Pro Val Pro Ser Pro Leu Val Gly Phe Ser Gln Phe Pro Gln Gln				
ctg acg cct ccc aga tcc cca agc cct gag ccc aca gtg gag gat gtg	275	280	285	864
Leu Thr Pro Pro Arg Ser Pro Ser Pro Glu Pro Thr Val Glu Asp Val				
ata tcc cag gtg gcc cgg gcc cat cga gag atc ttc acc tac gcc cat	290	295	300	912
Ile Ser Gln Val Ala Arg Ala His Arg Glu Ile Phe Thr Tyr Ala His				
gac aag ctg ggc agc tca cct ggc aac ttc aat gcc aac cat gca tca	305	310	315	960
Asp Lys Leu Gly Ser Ser Pro Gly Asn Phe Asn Ala Asn His Ala Ser				
ggt agc cct cca gcc acc acc cca cat cgc tgg gaa aat cag ggc tgc	325	330	335	1008
Gly Ser Pro Pro Ala Thr Thr Pro His Arg Trp Glu Asn Gln Gly Cys				
cca cct gcc ccc aat gac aac acc acc ttg gct gcc cag cgt cat aac	340	345	350	1056
Pro Pro Ala Pro Asn Asp Asn Asn Thr Leu Ala Ala Gln Arg His Asn				
gag gcc cta aat ggt ctg cgc cag gct ccc tcc tcc tac cct ccc acc	355	360	365	1104
Glu Ala Leu Asn Gly Leu Arg Gln Ala Pro Ser Ser Tyr Pro Pro Thr				
tgg cct cct ggc cct gca cac cac agc tgc cac cag tcc aac agc aac	370	375	380	1152
Trp Pro Pro Gly Pro Ala His His Ser Cys His Gln Ser Asn Ser Asn				
ggg cac cgt cta tgc ccc acc cac gtg tat gca gcc cca gaa ggc aag	385	390	395	1200
Gly His Arg Leu Cys Pro Thr His Val Tyr Ala Ala Pro Glu Gly Lys				
gca cct gcc aac agt ccc cgg cag ggc aac tca aag aat gtt ctg ctg	405	410	415	1248
Ala Pro Ala Asn Ser Pro Arg Gln Gly Asn Ser Lys Asn Val Leu Leu				
gca tgt cct atg aac atg tac ccc cat gga cgc agt ggg cga acg gtg	420	425	430	1296
Ala Cys Pro Met Asn Met Tyr Pro His Gly Arg Ser Gly Arg Thr Val				
cag gag atc tgg gag gat ttc tcc atg agc ttc acg ccc gct gtg cgg	435	440	445	1344
Gln Glu Ile Trp Glu Asp Phe Ser Met Ser Phe Thr Pro Ala Val Arg				

gag gtg gta gag ttt gcc aaa cac atc ccg ggc ttc cgt gac ctt tct			1392
Glu Val Val Glu Phe Ala Lys His Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu Ser			
450	455	460	
cag cat gac caa gtc acc ctg ctt aag gct ggc acc ttt gag gtg ctg			1440
Gln His Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys Ala Gly Thr Phe Glu Val Leu			
465	470	475	480
atg gtg cgc ttt gct tcg ttg ttc aac gtg aag gac cag aca gtg atg			1488
Met Val Arg Phe Ala Ser Leu Phe Asn Val Lys Asp Gln Thr Val Met			
485	490	495	
ttc cta agc cgc acc acc tac agc ctg cag gag ctt ggt gcc atg ggc			1536
Phe Leu Ser Arg Thr Tyr Ser Leu Gln Glu Leu Gly Ala Met Gly			
500	505	510	
atg gga gac ctg ctc agt gcc atg ttc gac ttc agc gag aag ctc aac			1584
Met Gly Asp Leu Leu Ser Ala Met Phe Asp Phe Ser Glu Lys Leu Asn			
515	520	525	
tcc ctg gcg ctt acc gag gag gag ctg ggc ctc ttc acc gcg gtg gtg			1632
Ser Leu Ala Leu Thr Glu Glu Leu Gly Leu Phe Thr Ala Val Val			
530	535	540	
ctt gtc tct gca gac cgc tcg ggc atg gag aat tcc gct tcg gtg gag			1680
Leu Val Ser Ala Asp Arg Ser Gly Met Glu Asn Ser Ala Ser Val Glu			
545	550	555	560
cag ctc cag gag acg ctg ctg cgg gct ctt cgg gct ctg gtg ctg aag			1728
Gln Leu Gln Glu Thr Leu Leu Arg Ala Leu Arg Ala Leu Val Leu Lys			
565	570	575	
aac cgg ccc ttg gag act tcc cgc ttc acc aag ctg ctg ctc aag ctg			1776
Asn Arg Pro Leu Glu Thr Ser Arg Phe Thr Lys Leu Leu Leu Lys Leu			
580	585	590	
ccg gac ctg cgg acc ctg aac aac atg cat tcc gag aag ctg ctg tcc			1824
Pro Asp Leu Arg Thr Leu Asn Asn Met His Ser Glu Lys Leu Leu Ser			
595	600	605	
ttc cgg gtg gac gcc cag tga			1845
Phe Arg Val Asp Ala Gln			
610	615		

<210> 4

<211> 614

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met	Thr	Thr	Leu	Asp	Ser	Asn	Asn	Asn	Thr	Gly	Gly	Val	Ile	Thr	Tyr
1									10						15
Ile	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Ser	Arg	Thr	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu
									20	25					30
Tyr	Ser	Asp	Asn	Ser	Asn	Gly	Ser	Phe	Gln	Ser	Leu	Thr	Gln	Gly	Cys
									35	40					45
Pro	Thr	Tyr	Phe	Pro	Pro	Ser	Pro	Thr	Gly	Ser	Leu	Thr	Gln	Asp	Pro
									50	55					60
Ala	Arg	Ser	Phe	Gly	Ser	Ile	Pro	Pro	Ser	Leu	Ser	Asp	Asp	Gly	Ser
									65	70					80
Pro	Ser	Phe	Tyr	Asn											
									85	90					95
Gly	Ser	Pro	Pro	Gly	Ser	Leu	Gln	Val	Ala	Met	Glu	Asp	Ser	Ser	Arg
									100	105					110
Val	Ser	Pro	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Asn	Ile	Thr	Lys	Leu	Asn	Gly	Met
									115	120					125
Val	Leu	Leu	Cys	Lys	Val	Cys	Gly	Asp	Val	Ala	Ser	Gly	Phe	His	Tyr
									130	135					140
Gly	Val	His	Ala	Cys	Glu	Gly	Cys	Lys	Gly	Phe	Phe	Arg	Arg	Ser	Ile
									145	150					160
Gln	Gln	Asn	Ile	Gln	Tyr	Lys	Arg	Cys	Leu	Lys	Asn	Glu	Asn	Cys	Ser
									165	170					175
Ile	Val	Arg	Ile	Asn	Arg	Asn	Arg	Cys	Gln	Gln	Cys	Arg	Phe	Lys	Lys
									180	185					190
Cys	Leu	Ser	Val	Gly	Met	Ser	Arg	Asp	Ala	Val	Arg	Phe	Gly	Arg	Ile
									195	200					205
Pro	Lys	Arg	Glu	Lys	Gln	Arg	Met	Leu	Ala	Glu	Met	Gln	Ser	Ala	Met
									210	215					220
Asn	Leu	Ala	Asn	Asn	Gln	Leu	Ser	Ser	Gln	Cys	Pro	Leu	Glu	Thr	Ser
									225	230					240
Pro	Thr	Gln	His	Pro	Thr	Pro	Gly	Pro	Met	Gly	Pro	Ser	Pro	Pro	Pro
									245	250					255
Ala	Pro	Val	Pro	Ser	Pro	Leu	Val	Gly	Phe	Ser	Gln	Phe	Pro	Gln	Gln
									260	265					270
Leu	Thr	Pro	Pro	Arg	Ser	Pro	Ser	Pro	Glu	Pro	Thr	Val	Glu	Asp	Val
									275	280					285
Ile	Ser	Gln	Val	Ala	Arg	Ala	His	Arg	Glu	Ile	Phe	Thr	Tyr	Ala	His
									290	295					300
Asp	Lys	Leu	Gly	Ser	Ser	Pro	Gly	Asn	Phe	Asn	Ala	Asn	His	Ala	Ser
									305	310					320
Gly	Ser	Pro	Pro	Ala	Thr	Thr	Pro	His	Arg	Trp	Glu	Asn	Gln	Gly	Cys
									325	330					335
Pro	Pro	Ala	Pro	Asn	Asp	Asn	Asn	Thr	Leu	Ala	Ala	Gln	Arg	His	Asn
									340	345					350

Glu Ala Leu Asn Gly Leu Arg Gln Ala Pro Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
355 360 365
Trp Pro Pro Gly Pro Ala His His Ser Cys His Gln Ser Asn Ser Asn
370 375 380
Gly His Arg Leu Cys Pro Thr His Val Tyr Ala Ala Pro Glu Gly Lys
385 390 395 400
Ala Pro Ala Asn Ser Pro Arg Gln Gly Asn Ser Lys Asn Val Leu Leu
405 410 415
Ala Cys Pro Met Asn Met Tyr Pro His Gly Arg Ser Gly Arg Thr Val
420 425 430
Gln Glu Ile Trp Glu Asp Phe Ser Met Ser Phe Thr Pro Ala Val Arg
435 440 445
Glu Val Val Glu Phe Ala Lys His Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu Ser
450 455 460
Gln His Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys Ala Gly Thr Phe Glu Val Leu
465 470 475 480
Met Val Arg Phe Ala Ser Leu Phe Asn Val Lys Asp Gln Thr Val Met
485 490 495
Phe Leu Ser Arg Thr Thr Tyr Ser Leu Gln Glu Leu Gly Ala Met Gly
500 505 510
Met Gly Asp Leu Leu Ser Ala Met Phe Asp Phe Ser Glu Lys Leu Asn
515 520 525
Ser Leu Ala Leu Thr Glu Glu Leu Gly Leu Phe Thr Ala Val Val
530 535 540
Leu Val Ser Ala Asp Arg Ser Gly Met Glu Asn Ser Ala Ser Val Glu
545 550 555 560
Gln Leu Gln Glu Thr Leu Leu Arg Ala Leu Arg Ala Leu Val Leu Lys
565 570 575
Asn Arg Pro Leu Glu Thr Ser Arg Phe Thr Lys Leu Leu Lys Leu
580 585 590
Pro Asp Leu Arg Thr Leu Asn Asn Met His Ser Glu Lys Leu Leu Ser
595 600 605
Phe Arg Val Asp Ala Gln
610

**DÉPARTEMENT DES BREVETS**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION**CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*02

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1/1

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W /260359

Vos références pour ce dossier (facultatif)	B0097FR <i>0200582</i>		
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL			
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) METHODE D'IDENTIFICATION DE SUBSTANCES CAPABLES DE MODULER LA DIFFERENTIATION ADIPOCYTAIRE			
LE(S) DEMANDEUR(S) : GENFIT			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		STAELS	
Prénoms		Bart	
Adresse	Rue	22, rue de la Houille	
	Code postal et ville	7850	PETIT ENGHEN (Belgique)
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) le 18 janvier 2002			
BECKER Philippe n° 97-0080			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.